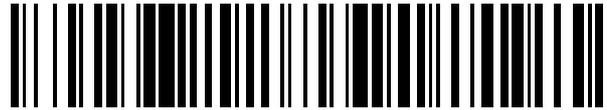


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 371**

21 Número de solicitud: 201230999

51 Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.06.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.01.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070444**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y  
SALUD (100.0%)**

**Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta  
Izq. Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93  
41092 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**RUBIO AMADOR, Ruth;  
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, René y  
MENEDEZ BUJÁN, Pablo**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

54 Título: **Células, líneas celulares y modelo animal no humano, para la determinación de agentes terapéuticos.**

57 Resumen:

Células, líneas celulares y modelo animal no humano, para la determinación de agentes terapéuticos.

La presente invención describe células madre mesenquimales aisladas diferenciadas a progenitor osteogénico, modificadas genéticamente mediante la delección de las secuencias o de un fragmento de las secuencias que codifican para la proteína p53 y la proteína Rb. Las células descritas en la presente invención tienen además la capacidad de originar tumores in vivo del tipo osteosarcoma. En la presente invención se describen también las líneas y poblaciones celulares, así como un modelo animal no humano al que se le han implantado dichas células madre osteosarcoma-like. Del mismo modo, la presente invención describe el método de obtención de dichas células y usos, preferentemente para el screening de agentes útiles en el tratamiento y/o prevención del sarcoma.

ES 2 440 371 A1

## DESCRIPCIÓN

### Células, líneas celulares y modelo animal no humano, para la determinación de agentes terapéuticos.

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina y la biotecnología, y se refiere a células madre mesenquimales procedentes de médula ósea diferenciadas a progenitores osteogénicos y modificadas genéticamente de manera que promueven tumores *in vivo* del tipo osteosarcoma, a las líneas celulares y, también, a un modelo animal no humano al que se le ha implantado dichas células madre *osteosarcoma-like*, para el *screening* de agentes útiles en el tratamiento y/o prevención del sarcoma, y preferentemente del osteosarcoma.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células madre/estromales mesenquimales multipotentes (mesenchymal stromal/stem cells ó MSCs) representan una población de células poco frecuentes presente en muchos tejidos que constituyen una fuente de progenitores mesodérmicos (García-Castro J. *et al.*, 2008. *J Cell Mol Med.* 12; 6; 2552-2565). La evidencia creciente sugiere que las MSCs pueden ser las células de origen o células iniciadoras de tumores capaces de iniciar sarcomagénesis, y varios tipos de sarcomas se han modelado mediante la inducción de la transformación de las MSCs con diferentes eventos oncogénicos (Rodríguez *et al.*, *Cell Res* 2012; 22:62-77). Los sarcomas son un grupo heterogéneo de tumores malignos de origen mesenquimal que se han agrupado históricamente como sarcomas de tejidos blandos (STS) y los sarcomas óseos primarios. Los sarcomas son generalmente estudiados una vez que los eventos de transformación ya se han producido y por lo tanto, los mecanismos de transformación no son susceptibles de análisis con muestras de los pacientes, destacando la necesidad de establecer *bona fide* modelos experimentales para recapitular la sarcomagénesis. El desarrollo de los modelos *in vivo* para distintos sarcomas es probable que constituyan un sistema sin precedentes para el ensayo de tratamientos específicos que sean más dirigidos y menos técnicos.

El fallo en la regulación del ciclo celular se asocia a menudo con el desarrollo del sarcoma. De hecho, las alteraciones en los genes Rb y p53 son las mutaciones más comunes que se encuentran en los sarcomas caracterizados por cariotipos complejos como el osteosarcoma y el leiomiomasarcoma (Helman y Meltzer, *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 685-694). Por otra parte, el síndrome de Li-Fraumeni, que es causado por mutaciones de p53 en la línea germinal y los pacientes con mutaciones en la línea germinal Rb, muestran una mayor frecuencia tanto de osteosarcomas como de STS (Helman y Meltzer, *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 685-694; Malkin, *Science*, 1990; 250: 1233-1238). Además, la inactivación del control del ciclo celular y la acumulación de inestabilidad genómica se han asociado con la transformación espontánea de las MSCs de ratón. Así mismo, *genetic targeting* de p53 en mMSCs desencadena un programa de transformación de las mMSCs.

p53 y Rb son reguladores clave de la homeostasis celular que controla el ciclo celular, la apoptosis, la senescencia, la proliferación y la diferenciación. En cuanto a la diferenciación mesenquimal, la activación de p53 suprime la diferenciación de los osteoblastos mediante la inhibición de la expresión de Runx2. Por el contrario, la supresión de p53 acelera la diferenciación osteoblástica, aunque dificulta la maduración terminal de los osteocitos. Además de la diferenciación osteoblástica, p53 también inhibe los programas adipogénicos y de diferenciación del músculo liso, regulando a la baja PPAR y MYOCD, respectivamente (Molchadsky, *PLoS ONE*, 2008; 3: e3707). Por otro lado, se ha visto que Rb regula la diferenciación mesenquimal lo largo de diferentes linajes mesenquimales, incluyendo osteoblástica, adipogénica y miogénica, a través de la regulación de la transcripción de varios factores de transcripción específicos del linaje (Thomas *et al.*, *Mol Cell.* 2001; 8: 303-31; Calo *et al.*, *Nature* 2010; 466: 1110-1114. Gutiérrez *et al.*, *Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 18402-18407; De Falco *et al.*, *Oncogene.* 2006; 25: 5244-5249). Por ejemplo, la deficiencia de Rb parece afectar el desarrollo óseo a favor de la diferenciación adipogénica (Calo *et al.*, *Nature* 2010; 466: 1110-1114. Gutiérrez *et al.*, *Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 18402-18407).

Los modelos de ratón que muestran la inactivación específica de p53 sólo o en combinación con Rb en el linaje osteoblástico a través de la expresión de Cre dirigida por Otxerix desarrollaron osteosarcoma (Berman *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 11851-11856; Walkley *et al.*, *Genes Dev.* 2008; 22: 1662-1676). Asimismo, otro modelo de ratón en el que se inactivaron p53 y Rb en los tejidos mesenquimales tempranos de las extremidades embrionarias también resultó en el desarrollo del sarcoma, principalmente de osteosarcoma, aunque la supresión concomitante de Rb condujo a un incremento en la prevalencia de STS indiferenciados (Lin *et al.*, *Carcinogenesis*, 2009 30: 1789-1795). En contraste con estos trabajos que relacionan la deficiencia de p53 y Rb con el desarrollo de osteosarcoma, se ha informado anteriormente de que MSCs p53<sup>-/-</sup> y p53<sup>-/-</sup>Rb<sup>-/-</sup> derivadas de tejido adiposo de (ASCs) dan lugar a tumores como el leiomiomasarcoma (*leiomyosarcoma-like*), en ratones inmunodeficientes, y en ningún caso se observaron las características histopatológicas de osteosarcoma.

Por tanto, se hace necesaria la generación y el establecimiento de líneas celulares que permitan el desarrollo de modelos de osteosarcoma ajustados al modelo jerárquico del cáncer para estudiar la patogénesis y abordar la identificación de fármacos específicos dirigidos contra las células iniciadoras del sarcoma.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la invención proponen que hay dos factores principales previamente no explorados que potencialmente influyen en el fenotipo del sarcoma, explicando al menos en parte, las controversias entre los estudios anteriores:

- (i) el distinto tejido fuente de la MSCs transformada, y
- (ii) el diferente estado de diferenciación a lo largo de un linaje particular.

Con el fin de abordar estas dos cuestiones, los inventores obtuvieron MSCs a partir de tejido adiposo (ASCs) y de la médula ósea (BM-MSCs) de ratones  $p53^{loxP/loxP}$ , de ratones  $Rb^{loxP/loxP}$ , o del doble  $p53^{loxP/loxP} Rb^{loxP/loxP}$  y después de la delección mediada por Cre se comparó el potencial tumorigénico de:

- (i) ASCs indiferenciadas  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  frente a los mismos genotipos de BM-MSC indiferenciadas, y
- (ii) BM-MSCs  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  indiferenciadas frente a progenitores osteogénicos derivados de BM-MSCs a los que se les ha delecionado  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ . (los progenitores osteogénicos ya provienen de BM-MSCs  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ ).

Los autores demuestran que tanto las BM-MSCs  $p53^{-/-}$  como las  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  indiferenciadas inician la formación de leiomiomas idénticos a los resultados con ASCs  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ , lo que indica que la fuente del tejido de las MSCs no parece determinar el fenotipo de desarrollo del sarcoma *in vivo*. Sin embargo, los progenitores osteogénicos  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  diferenciados de BM-MSCs desarrollaron tumores *osteosarcoma-like* cuando se inocularon en ratones inmunodeficientes, lo que sugiere que el estadio de diferenciación de las MSCs  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  impone el fenotipo de los sarcomas desarrollados *in vivo* y que los progenitores osteogénicos, más que MSCs indiferenciadas, parecen ser la célula de origen para el desarrollo del osteosarcoma.

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para generar nuevas células primarias generadoras de osteosarcoma, que se ajustan al modelo jerárquico del cáncer, así como un modelo animal subcutáneamente trasplantado con dichas células.

## CÉLULAS, LÍNEAS CELULARES Y MÉTODO DE OBTENCIÓN

Un primer aspecto de la invención se refiere a una célula madre mesenquimal aislada (MSC), de ahora en adelante célula de la invención, diferenciada a progenitor osteogénico, modificada genéticamente y con capacidad de originar un osteosarcoma, que comprende la delección de la secuencia o de un fragmento de la secuencia que codifica la proteína p53. En una realización preferida la célula madre se ha obtenido de médula ósea.

En otra realización preferente de este aspecto de la invención, la secuencia o el fragmento de la secuencia delecionada que codifica a la proteína p53 es la SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos. En otra realización más preferida, la célula además comprende la delección de la secuencia que codifica para la proteína Retinoblastoma (Rb). En una realización aún mucho más preferente, la secuencia delecionada que codifica a la proteína Rb es la SEQ ID NO: 3, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.

Dichas variantes incluyen sustituciones, delecciones (supresiones) e inserciones, que mantengan las propiedades de las proteínas que codifican (p53 y Rb). En general, se prefieren las sustituciones conservativas que codifiquen para los mismos aminoácidos. Dichas variantes o fragmentos biológicamente activos presentan, preferentemente, una identidad de al menos un 50%, más preferentemente de al menos un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o mucho más preferentemente de al menos un 99% con la SEQ ID NO: 1 en el caso de la proteína p53, y con la SEQ ID NO: 3 en el caso de la proteína Rb, respectivamente.

Tal como se ha mencionado, estas MSCs indiferenciadas  $p53^{-/-}$  o  $p53^{-/-}Rb^{-/-}$ , cuando proceden de médula ósea (BM-MSCs), originan leiomiomas *in vivo* (tumores blandos de músculo liso), al igual que las derivadas de ASC. Estos leiomiomas muestran características histológicas típicas, una latencia corta y muestran áreas necróticas. Estos datos, por tanto, revelan un papel inductor de p53 en el desarrollo de leiomiomas, mientras que Rb parece potenciar y/o modular la transformación de las MSCs.

Por el contrario, cuando se depleciona  $p53^{-/-}$  o  $p53^{-/-}Rb^{-/-}$  en progenitores osteogénicos que proceden de BM-MSCs (*BM-MSC-osteogenic derivatives*), originan osteosarcomas *in vivo* (tumores del tejido óseo). Estos osteosarcomas muestran características histológicas de matriz osteoide. Por tanto, preferentemente la célula de la invención procede de un progenitor osteogénico.

En otra realización más preferente de este aspecto de la invención, pero sin limitarse, la médula ósea de la que procede la célula mesenquimal aislada es de un mamífero no humano. Más preferentemente, el mamífero es un ratón.

Estas células madre son células adultas, esto es, no se han obtenido de un embrión sino de tejido post-natal y adulto. El término "célula madre adulta" significa que la célula madre es aislada de un tejido o un órgano de un animal en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario. Preferiblemente, las células madre de la

invención han sido aisladas en un estado post-natal. Más preferentemente han sido aisladas de un mamífero. El término mamífero, tal como se entiende en esta memoria, hace referencia a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, clase *Mammalia*.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una línea celular derivada de una célula aislada de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población celular que comprende al menos una célula de la invención. En una realización preferida la población celular de la invención comprende al menos un 20%, preferiblemente un 40%, y aún más preferiblemente un 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o un 99% de células de la invención.

El término "aislada" indica que la célula o la población celular de la invención a la que se refiere, no se encuentran en su ambiente natural. Esto es, la célula o la población celular ha sido separada de su tejido circundante. Particularmente significa que dicha célula o la población celular está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en su ambiente natural.

También se refiere a las células o poblaciones celulares que han sido aisladas del organismo en el que se originan. El término también incluye células que han sido aisladas de un organismo y re-introducidas en el mismo organismo, o en otro.

El gen p53 o *tumor protein p53* (*TP53*, *FLJ92943*, *LFS1*, *P53*, *TRP53*, *antigen NY-CO-13*; *cellular tumor antigen p53*; *mutant p53 protein*; *p53 tumor suppressor*; *phosphoprotein p53*; *transformation-related protein 53*; *truncated p53 protein*; *tumor suppressor TP53*), se encuentra en el cromosoma 17 (17p13.1) responde al estrés celular para regular los genes diana que inducen la detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, la reparación del ADN, o cambios en el metabolismo. Actúa como un supresor tumoral. Los mutantes de p53 que con frecuencia se producen en diferentes cánceres humanos fracasan para enlazar el sitio consenso de unión de ADN, y por lo tanto se produce la pérdida de la actividad supresora de tumores. Las alteraciones de este gen se producen no sólo como mutaciones somáticas en tumores humanos, sino también como mutaciones germinales en algunas familias propensas al cáncer de Li-Fraumeni. Se han encontrado múltiples variantes de p53, debido a los promotores alternativos y *splicing* alternativo múltiple. Estas variantes codifican isoformas distintas, que pueden regular la actividad transcripcional de p53. Por ejemplo, pero sin limitarse, la isoforma a, que es la que se recoge en esta memoria.

En el contexto de la presente invención, p53 se define también, pero sin limitarse, por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 30%, un 50%, un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína p53. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 1.

El gen RB1 o retinoblastoma 1 (*RP11-174I10.1*, *OSRC*, *RB*, *p105-Rb*, *pRb*, *pp110*, *retinoblastoma susceptibility protein*; *retinoblastoma-associated protein*), se encuentra en el cromosoma 13 (13q14.2). La proteína codificada por este gen es un regulador negativo del ciclo celular. Los defectos en este gen son la causa del cáncer infantil retinoblastoma (RB), cáncer de vejiga, y el sarcoma osteogénico, entre otros.

En el contexto de la presente invención, RB1 se define también, pero sin limitarse, por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 30%, un 50%, un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína RB1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la

secuencia SEQ ID NO: 3.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de obtención de la célula, de la población celular o de la línea celular de la invención, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- 5 a) cultivar las células madre mesenquimales descritas en la invención en un medio de diferenciación osteogénica, hasta obtener un progenitor osteogénico, y  
 b) delecionar la secuencia que codifica la proteína p53 y la proteína Rb en un progenitor osteogénico diferenciado de BM-MSC.

10 Preferentemente, la secuencia delecionada que codifica a la proteína p53 es la SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos. Más preferentemente, la secuencia delecionada que codifica a la proteína Rb es la SEQ ID NO: 2, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos. Como se ha dicho, las MSCs proceden de médula ósea.

15 El primer método de la invención, que es un método de obtención de progenitores osteogénicos con capacidad de originar un osteosarcoma, preferentemente además comprende:

- c) implantar un progenitor osteogénico obtenible en el paso (b), en un mamífero no humano según se describe más adelante, para inducir un tumor primario,  
 d) disgregar mecánicamente el tumor primario de (c), y  
 20 e) cultivar el tumor primario en medios de cultivo de MSCs para establecer líneas celulares inmortalizadas

Otro aspecto de la invención se refiere al progenitor osteogénico con capacidad de originar un osteosarcoma obtenible por el primer método de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a una línea celular inmortalizada obtenibles por el primer método de la invención

Adicionalmente, la célula, población celular o línea celular de la invención pueden obtenerse de los sarcomas implantados en el modelo animal que se describen más adelante. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una célula, una población celular o una línea celular obtenible del osteosarcoma implantado en el modelo animal de la invención.

### COMPOSICIONES DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende una célula de la invención, la línea celular de la invención o una población celular de la invención.

Las células adultas de la invención, la población celular de la invención, así como la composición de la invención, pueden formar parte de una composición farmacéutica para su administración o par su implantación subcutánea a un mamifero no humano, por ejemplo pero sin limitarnos, para la implantación subcutánea en un modelo animal, preferentemente en un ratón. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una célula adulta aislada de la invención ó una población celular de la invención. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere preferiblemente, pero sin limitarse, a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en animales no humanos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar las células o la población celular de la invención o de dicha composición que comprende células madre o células osteoprogenitoras de la invención obtenible según el procedimiento de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichas células. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho vehículo incluyen cualquier vehículo fisiológicamente compatible, por ejemplo, soluciones isotónicas (e.g., solución salina estéril al 0,9% NaCl, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), solución Ringer-lactato, etc.), opcionalmente suplementadas con suero, preferiblemente con suero autólogo; medios de cultivo celular (e.g., DMEM, etc.); o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como colágeno, colagen-glicosamino-glicano, fibrina, cloruro de polivinilo, poliaminoácidos, tales como polilisina, o poliornitina, hidrogeles, agarosa, sulfato de dextrano silicona. Asimismo, si se desea, el medio de soporte puede, en realizaciones específicas, contener factores de crecimiento u otros agentes. Si el soporte es sólido, semisólido, o gelatinoso, las células pueden ser introducidas en una fase líquida del vehículo que es tratada posteriormente de forma tal que se convierte en una fase más sólida.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario,

aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto deseado de las células, los cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes, conservantes, etc. También, para estabilizar la suspensión celular, es posible añadir quelantes de metales. La estabilidad de las células en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede mejorarse mediante la adición de sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, etcétera. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, por los técnicos en la materia y se usan normalmente en la elaboración de composiciones celulares. Más específicamente, son adecuados para su uso en mamíferos no humanos. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

#### MODELO ANIMAL DE LA INVENCION Y MÉTODO DE OBTENCIÓN

Otro aspecto de la invención se refiere a un mamífero no humano que comprende al menos una célula de la invención, una línea celular de la invención, una población celular, o una composición de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano de la invención comprende las células, poblaciones celulares o composiciones trasplantadas subcutáneamente.

Un "xenotrasplante", "heterotrasplante" o "trasplante heterólogo", es el trasplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra, idealmente entre especies próximas para evitar rechazo. Tales materiales se suelen llamar "xenoinplantos" o "xenotrasplantes". También pueden hacerse implantes dentro de la misma especie

Tal como se utiliza en la presente invención el término "mamífero no humano" se refiere a un animal mamífero no humano de cualquier fondo genético, preferentemente animales de laboratorio como roedores, más preferentemente ratas y ratones, o primates no humanos. Dicho animal no humano puede tener, prácticamente, cualquier fondo genético conocido, es decir, puede tratarse de un animal tipo salvaje (*wild-type* ó *wt*) o se puede combinar con otras alteraciones genéticas en el mismo ratón, por ejemplo, un animal transgénico, mutante o deficiente (*knock-out* ó *KO*), con mutaciones espontáneas o inducidas experimentalmente, así mismo en cualquier fondo genético. Preferentemente, el mamífero de la invención es un ratón (*Mus musculus*), y aún más preferentemente es un ratón NOD/SCID IL2Ry<sup>-/-</sup> (NSG).

Los ratones NSG, ó NOD SCID gamma, (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) son una de las variedades endogámicas de ratones de laboratorio más inmunodeficientes descritos hasta la fecha (Shultz *et al.*, 2007. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2): 118–130). Los ratones NSG carecen de células maduras T, células B y células natural killer (NK). Los ratones NSG también son deficientes en varias citocinas de vías de señalización, y tienen muchos defectos en la inmunidad innata. Las inmunodeficiencias de estos ratones permiten el injerto de una amplia gama de células humanas primarias, y permitir así el modelado sofisticado de muchas áreas de la biología humana y la enfermedad.

El fondo genético, derivado de los ratones NOS/ShiLtJ, contribuye a la reducción de la inmunidad innata, que incluyen un sistema de ausencia de complemento hemolítico, reducción de la función de células dendríticas, y defectuosa actividad de los macrófagos. Al fondo NOD/ShiLtJ también contribuye un alelo del gen Sirpa que hace el nicho de la médula ósea muy permisiva a la colonización por las células madre hematopoyéticas.

La mutación *Prkdc*<sup>scid</sup>, conocida comúnmente como "SCID" o "*inmunodeficiencia combinada severa*", elimina esencialmente la inmunidad adaptativa. *Prkdc*<sup>scid</sup> es una mutación de pérdida de función en el homólogo de ratón del gen humano *PRKDC*, que codifica una proteína que resuelve la ruptura sw la cadena de ADN que se producen durante la recombinación V(D)J en el desarrollo de los linfocitos T y B. Los ratones homocigotos para la mutación tienen reducido drásticamente el número de células T y células B maduras. La penetrancia fenotípica de *Prkdc*<sup>scid</sup> varía entre los antecedentes de tensión puras, pero la mutación es más eficaz en la eliminación de la inmunidad adaptativa en el fondo genético NOD.

La mutación *Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup> es una mutación completa nula en el gen que codifica la cadena gamma del receptor de la interleuquina-2 (IL2Ry, homóloga a IL2RG en los humanos). IL2Ry es un componente común de los receptores de superficie celular que se unen y las señales de distinta transduce seis interleucinas. La señalización a través de IL2Ry es necesaria para la diferenciación y la función de muchas células hematopoyéticas. En particular, la ausencia de IL2Ry bloquea la diferenciación celular de NK, y por lo tanto elimina un obstáculo importante que impide el injerto eficiente de células humanas primarias.

Los ratones NOD/SCID IL2Ry<sup>-/-</sup> de la invención, no rechazan el injerto de células madre o progenitores osteogénicos, y preservan el microambiente tumoral durante mucho tiempo. Además, presentan una esperanza de vida superior a los 16 meses y no desarrolla linfoma tímico, lo que les convierte en la cepa más adecuada para xeno-trasplantes.

Los seres humanos y los ratones de laboratorio (ambos mamíferos euterios) tienen más genes en común que los que se podrían encontrar entre los humanos y animales no-euterios. El parecido genético entre las dos especies permite comparar los genes casi directamente, y permite a los científicos encontrar los mismos genes en humanos para decodificar las rutas y mecanismos de las enfermedades humanas, porque los ratones también pueden desarrollarlas.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de obtención del modelo animal de la invención que comprende:

a) obtener una célula, una población celular o una línea celular de la invención según se describe en el primer método de la invención,

b) implantar la célula, la población celular o la línea celular de la invención en un modelo animal no humano, en una parte determinada, preferentemente en el flanco.

Preferentemente, el modelo animal no humano es un ratón, y más preferentemente, un ratón NOD/SCID IL2R $\gamma$ -/-

#### USOS DE LAS CÉLULAS, POBLACIONES CELULARES, COMPOSICIONES Y MAMÍFEROS NO HUMANOS DE LA INVENCION Y MÉTODO DE SCREENING DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS.

Las células de la invención, implantadas subcutáneamente en un mamífero no humano, mantienen todas las propiedades morfológicas, fenotípicas y funcionales de los progenitores osteogénicos de los que proceden y son capaces de originar osteosarcomas de forma agresiva. Estas células representan una herramienta sin precedentes dado que están integradas por células primarias genéticamente modificadas que constituyen un modelo inequívoco de osteosarcoma. Por tanto pueden ser empleadas en multitud de estudios encaminados a entender las bases celulares y moleculares responsables de la etiología y patogénesis de estos sarcomas así como una plataforma *in vivo* para testar diferentes agentes terapéuticos capaces de destruir de forma específica las células tumorales pero no las células normales llevándose a cabo ensayos de "high-throughput screening".

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una célula de la invención, una línea celular, una población celular, una composición, o un modelo animal de la invención, para la detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer. En una realización preferente, se usan para la detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del sarcoma, y más preferentemente del osteosarcoma.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende:

a) poner en contacto o administrar el agente a testar a una célula de la invención, una línea celular, una población celular, una composición o a un modelo animal de la invención,

b) determinar si el agente a testar inhibe la capacidad proliferativa y oncogénica de las células tumorales.

Preferentemente, el tercer método de la invención es un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del sarcoma, y más preferentemente del osteosarcoma.

Así, por ejemplo pero sin limitarnos, los tumores, preferiblemente sarcomas, y aún más preferiblemente osteosarcomas, se generan por inyección subcutánea en ratones NOD / SCID IL2R $\gamma$ -/- de entre 5x10<sup>6</sup> y 10x10<sup>6</sup> de células de la invención en PBS con 0.1% de glucosa. Cuando los tumores han alcanzado un tamaño medio de 200 mm<sup>3</sup>, se distribuyen los animales por grupos de manera aleatoria y se les inyecta peritumoralmente el agente a testar correspondiente. Se miden los tumores con un calibre externo, calculando su volumen de acuerdo con la siguiente fórmula:  $(4\pi/3) \times (\text{ancho}/2)^2 \times (\text{largo}/2)$ . Al final del tratamiento, los animales se sacrifican, se extraen los tumores y se determina su peso. Este procedimiento no es limitante, y la detección de la inhibición de las células tumorales puede hacerse por cualquier otro método conocido en el estado de la técnica.

En la presente invención, se entiende por "agente" cualquier compuesto químico de origen natural o sintético, o cualquier agente biológico, con una actividad terapéutica, preferiblemente génica o farmacológica. Los conceptos de terapia génica así como el de terapia farmacológica son bien conocidos para un experto en la materia.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende la célula de la invención, la línea celular de la invención o la población celular de la invención. Dicho kit puede comprender otros reactivos necesarios para llevar a cabo el tercer método de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de la invención, para un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer, preferentemente del sarcoma, y aún más preferentemente del osteosarcoma.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de

la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

**Figura 1: Generación y confirmación de los genotipos de MSC utilizados en el presente estudio. (A)** Dibujos que representan MSCs wt,  $Rb^{loxP/loxP}$ ,  $p53^{loxP/loxP}$  y  $Rb^{loxP/loxP}p53^{loxP/loxP}$ . Las MSCs fueron obtenidas a partir de tejido adiposo (ASCs) y la médula ósea (BM-MSCs) e infectadas con vectores adenovirales expresando la enzima Cre recombinasa, generando wt,  $Rb^{-/-}$ ,  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  ASC/BM-MSC. **(B)** La PCR genómica confirma la delección de p53 o Rb en los genotipos MSC indicados.  $\beta$ -actina se utilizó como control *housekeeping*. **(C)** Western blot realizado en presencia o ausencia de la camptotecina (CPT; 0,5 mmol / L durante 24 horas), que confirma la falta de expresión de p53 o bien la proteína Rb en los genotipos MSC indicados.  $\beta$ -actina se utilizó como control *housekeeping*. **(D)** Incidencia del tumor para BM-MSC  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ . La incidencia estimada del tumor tras 120 días fue de 28% vs 75%, respectivamente ( $p=0.04$ ). **(E)** Análisis histológico de los tumores desarrollados en ratones NOD/SCID infundidos con BM-MSC  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ . Se muestra tinción de H&E, caldesmón, actina y miosina de músculo liso. Aumento original es de 20x. El recuadro muestra magnificación 60x.

**Figura 2: Análisis comparativo de los perfiles de expresión génica entre las células  $p53^{-/-}$ ,  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ , Tbmp53 y TbmRbp53 apoyando el diagnóstico histológico de leiomioma, independientemente de la fuente de las MSCs (ASCs y BM-MSCs). (A)** Tras el análisis de microarrays de expresión génica, fueron analizados los genes expresados con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; expresión > 2 veces arriba o hacia abajo) en la grasa o médula ósea  $p53^{-/-}$ ,  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ , Tbmp53 (TP53) y TbmRbp53 (TRbp53) en comparación con ASC/BM-MSC-wt. Los genes diferencialmente regulados fueron analizados utilizando el software *Ingenuity Pathways Analysis 8* (IPA). IPA Software está basado en la minería de datos seleccionando los genes expresados diferencialmente y se clasifica como asociada a los sarcomas. Como se puede observar, todos los genes expresados diferencialmente se asociaron a leiomioma u otras formas de sarcomas músculo-derivados en lugar de sarcomas que afectan a otros tejidos, lo que confirma el diagnóstico molecular de leiomioma, independientemente de la fuente de las MSCs. **(B)** Diagramas de Venn que representa el número de genes expresados diferencialmente entre Tbmp53 (izquierda) y TbmRbp53 (derecha) y wt ASC o wt BM-MSC. Entre 40-62% de los genes expresados diferencialmente entre MSC tumorales y MSC wt fueron comunes para wt ASC y wt BM-MSC, que también confirma que el tejido fuente de MSCs no parece crucial para determinar el fenotipo del desarrollo del sarcoma *in vivo*. **(C)** Esquema proporcionado por el software IPA específicamente mostrando los genes relacionados con el desarrollo del leiomioma común o únicamente alterada en Tbmp53 y TbmRbp53 en comparación con las MSCs wt. Las vías de señalización NF- $\kappa$ B, PTEN, PI3K/AKT e IL-8 son las rutas más frecuentemente alterada tanto en Tbmp53 como en TbmRbp53.

**Figura 3: Diferenciación osteogénica inducida de  $Rb^{loxP/loxP}p53^{loxP/loxP}$  BM-MSC no diferenciadas y posterior infección adeno-Cre. (A)** Esquema del protocolo de diferenciación osteogénica con infección adeno-Cre después de los días 2, 5 y 10 para generar mutantes  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$ BM-MSC. **(B)** PCR genómica confirma la depleción casi total de ambos p53 y Rb. **(C)** Q-RT-PCR que confirma la regulación de los factores de transcripción de la osteogénesis indicados (osterix, BMP4, osteopontin, colágeno tipo I, osteocalcin) bajo la diferenciación osteogénica inducida (\*,  $p$ -value < 0.05 vs células indiferenciadas). **(D)** La coloración rojo de alizarin confirma la diferenciación *in vitro* funcional osteogénica en el tiempo.

**Figura 4: Progenitores osteogénicos BM-MSC  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  osteogénicamente comprometidos originan osteosarcoma *in vivo* en vez de leiomioma. (A)** capacidad de formación de tumores *in vivo* y el fenotipo del tumor de célula indiferenciadas y progenitores osteogénicos BM-MSC  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  inoculados en ratones inmunodeficientes. **(B)** Análisis histológico (10x [paneles superiores] y 40x [paneles de fondo]) de los tumores desarrollados en ratones NOD/SCID infundidos con BM-MSC  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  indiferenciadas (izquierda) o progenitores osteogénicos BM-MSC  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  (en el centro y los paneles de la derecha). Se muestra la tinción para H & E. OS; matriz osteoide bien formada.

**Figura 5: Las líneas celulares ex vivo Inmortalizadas  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  derivadas de tumores primarios reproducen el desarrollo del leiomioma tras la inoculación secundaria en ratones NOD/SCID con 100% de penetración y una latencia mucho más corta. (A)** Las líneas celulares tumorales ex vivo derivadas de leiomiomas primarios formados por  $p53^{-/-}$  y  $Rb^{-/-}p53^{-/-}$  BM-MSC (denominadas Tbmp53 y TbmRbp53, respectivamente) retuvieron la delección p53 y/o Rb. **(B)** La capacidad de formación de tumores *in vivo* (penetrancia y latencia) y el fenotipo del tumor de las líneas celulares Tbmp53 y TbmRbp53 inoculadas en ratones inmunodeficientes. **(C)** Análisis histológico de los tumores secundarios desarrollados en ratones NOD/SCID infundidos con Tbmp53 (izquierda) y TbmRbp53 (derecha). Se muestra tinción de H&E, caldesmón y actina de músculo liso. El aumento original es de 20x. El recuadro muestra una magnificación 60x.

**Figura 1S: Caracterización fenotípica y funcional de los genotipos de las MSCs usados en el presente estudio. (A)** Perfil inmunofenotípico de los genotipos de BM-MSC analizados por citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos representativos para Sca-1, CD29, CD44, CD14, CD11b y CD45. Las líneas vacías

representan los isotipos irrelevantes. Las áreas rellenas muestran anticuerpos específicos de la tinción. **(B)** Se indica la diferenciación potencial de BM-MSc adipogénica (paneles superiores) y osteogénica (paneles inferiores) con los distintos genotipos.

5 **Figura 2S: Análisis histológico de los tumores en ratones NOD/SCID inoculados con p53<sup>-/-</sup> (izquierda) y ASC Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (derecha).** Se muestra la tinción para H&E, caldesmón, actina de músculo liso y miosina. El recuadro muestra aumento de 40x.

10 **Figura 3S. Líneas celulares inmortalizadas p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> ex vivo derivadas de tumores primarios reinician el desarrollo del sarcoma tras la inoculación secundaria en ratones NOD/SCID con 100% de penetración y latencia mucho más corta.** **(A)** Las líneas de células tumorales derivadas ex vivo de leiomiomas primarios formados por BM-MSc p53<sup>-/-</sup> and Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (denominado Tbmp53 y TbmRbp53, respectivamente) mantuvieron la depleción de p53 y/o Rb. **(B)** Capacidad de formación de tumores *in vivo* (penetrancia y la latencia) de la líneas celulares Tbmp53 y TbmRbp53 inoculadas en ratones inmunodeficientes secundarios. **(C)** Análisis histológico representativo de los tumores secundarios desarrollados en ratones NOD/SCID infundidos con Tbmp53 y TbmRbp53. Se muestra la tinción para H&E, caldesmón y actina de músculo liso. Aumento original es 20x

20 **Figura 4S.** Lista completa de los genes asociados a los leiomiomas u otras formas de sarcomas derivados de músculo expresados diferencialmente (valor de p <0,05; expresión de > 2 veces arriba o hacia abajo) en ASC/BM-MSc p53<sup>-/-</sup> and Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>, Tbmp53 y TbmRbp53 en comparación con wt-ASC/BM-MSc (ver **Figura 2**).

25 **Figura 5S. Diferenciación osteogénica de la ASC Rb<sup>loxP/loxP</sup>p53<sup>loxP/loxP</sup> y posterior infección por adeno-Cre.** **(A)** Esquema del protocolo de diferenciación osteogénica con adeno-Cre infección después de 2, 5, y 10 días para generar mutantes Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> ASCs/progenitores osteogénicos. **(B)** PCR genómica confirmando la depleción completa de p53 y Rb. **(C)** q-RT-PCR que confirma la *up-regulation* de los factores de transcripción específicos indicados bajo la diferenciación osteogénica inducida (\*, valor de p <0.05 vs células indiferenciadas). **(D)** Tinción Rojo de alizarina confirmando la diferenciación funcional osteogénica *in vitro* en el tiempo.

30 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

35 **Materiales y métodos**

**Generación de mutantes MSC**

40 Se obtuvieron MSCs de la médula ósea (BM) de ratones con fondo FVB con alelos tanto para p53, para Rb o para ambos genes, flanqueados por secuencias Lox-P. Se obtuvieron células de la BM usando una jeringa con medio de crecimiento completo de MSCs (DMEM-Advanced, el 10% de SFB, 1% de penicilina / estreptomina y un 1% Glutamax (todos de Gibco). La suspensión celular obtenida se pasó por un filtro de nylon 70µm (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA), se lavó dos veces y se sembró a una densidad de 25 x 10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup> en medio MesenCult (Tecnologías de Células Madre, Vancouver, Canadá) a 37 ° C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, las células no adherentes fueron descartados y se añadió medio fresco a los cultivos, y se establecieron cultivos de a partir de cuatro cepas de ratón: (a) wt, (b) Rb<sup>loxP/loxP</sup>, (c) p53<sup>loxP/loxP</sup> y (d) p53<sup>loxP/loxP</sup> Rb<sup>loxP/loxP</sup>. BM-MSCs mutantes se han generado por la escisión de las secuencias flanqueadas por loxP por la infección de todos los cultivos de MSC con vectores adenovirales que expresan el gen de recombinasa Cre-bajo el control del promotor CMV (Ad-CMV-Cre). El éxito de la obtención del knockdown y la posterior generación de cultivos de MSCs p53<sup>-/-</sup>, Rb<sup>-/-</sup> y p53<sup>-/-</sup>-Rb<sup>-/-</sup> después de la escisión de las regiones LoxP fue confirmado por PCR genómica y Western Blot. Las células obtenidas se usaron solo entre 5 y 15 pases para experimentos posteriores.

55 **PCR Genómica**

60 El ADN total se extrajo utilizando el kit de DNAeasy (Qiagen, Alameda, CA). 200 ng de ADN se utilizaron para cada reacción de PCR. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: pre-desnaturalización a 94 ° C durante 5 min seguido por 29 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, hibridación a 62 ° C (para el p53), 60 ° C (por Rb) o 67 ° C (por β-actina) durante 30 segundos y extensión a 72 ° C durante 50 segundos. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 1S.

65

Tabla 1S: Secuencias de los primers usados para la presente invención.

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<b>p53</b>	AAGGGGTATGAGGGACAAGG	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG
<b>Rb</b>	GCGGTGTGCCATCAATG	AACTCAAGGGGAGACCTG
<b>Collagen-type 1</b>	CGAGTCACACCGAACTTGG	GCAGGCAGGGCCAATGTCTA
<b>Osteopontin</b>	TGCTTTTGCCTGTTTGGCAT	TTCTGTGGCGCAAGGAGATT
<b>Osterix</b>	GCAAGGCTTCGCATCTGAAAA	AACTTCTTCTCCCGGGTGTGA
<b>BMP-4</b>	TAAGAAGTGGCTGCGCCATT	GGCCACAATCCAATCATTCC
<b>Osteocalcin</b>	CTGACCCTGGCTGCGCTCTG	GGCTGGGACTGAGGCTCCA
<b>β-Actin</b>	GCCATCCAGGCTGTGCTGTC	TGAGGTAGTCTGTCAGGTCC

## 5 Western Blot

Se prepararon extractos completos de células en crecimiento exponencial en tampón de lisis RIPA que contiene un cóctel completo de inhibidores de la proteasa (Roche). Se resolvieron 40 µg de proteína en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) utilizando anticuerpos anti-p53 (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Rb (dilución 1:750, BD-Pharmingen, San Jose, CA) y anti-β-actina (1:20.000; Sigma), seguido de 2 horas de incubación con anti-mouse-HRP (Millipore). Las proteínas se detectaron mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia (BioRad) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

## 15 Diferenciación de las MSC

Para los ensayos de diferenciación, las MSC se sembraron a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio MesenCult y se permitió que se adhiran a las 24 horas. El medio de cultivo fue entonces sustituido por un medio de diferenciación inductiva específica. Para la diferenciación adipogénica, las células fueron cultivadas en el kit de diferenciación AdipoCult (Stem Cell Technologies) de 15 a 20 días. Los cultivos celulares diferenciados fueron teñidos con Oil Red O (Amresco, Solon, OH). Para la diferenciación osteogénica, las células fueron cultivadas en el medio de diferenciación la diferenciación Osteogenic MSCs Differentiation BulletKit (Lonza) durante 2 semanas. Los cultivos celulares se tiñeron con rojo de alizarina S (Sigma).

## 25 Citometría de Flujo

El inmunofenotipo de las MSCs cultivadas se analizó por citometría de flujo. Las células fueron tripsinizadas, lavadas, y se suspendieron en PBS con BSA al 1%. Un total de  $2 \times 10^5$  células fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos con un fluorocromo conjugado con anticuerpos monoclonales para Sca-1, CD11b, CD34, CD45, CD44, CD29 y (Becton Dickinson). Posteriormente se lavaron y se analizaron en un citómetro de FACSCanto II (Becton Dickinson).

## 30 Ensayo de diferenciación osteogénica

Se sembraron MSCs  $Rb^{loxP/loxP}$   $p53^{loxP/loxP}$  y se cultivaron hasta que se llegó a la confluencia máxima. Entonces, el medio basal fue cambiado por medio osteogénico de diferenciación de MSCs (BulletKit, Lonza) para dirigir la diferenciación hacia el linaje osteogénico. Después de 2, 5 y 10 días en condiciones de cultivo de diferenciación osteogénica, las MSCs en diferenciación se infectaron con Ad-CMV-Cre de elevada titulación. El éxito del compromiso con el linaje osteogénico y la generación de derivados osteogénicos MSCs  $p53^{-/-}Rb^{-/-}$  (progenitores) fue confirmada por Q-RT-PCR y PCR genómica, respectivamente.

## 40 PCR cuantitativa

El ARN total fue extraído de cultivos de MSCs inducidas a diferenciarse hacia el linaje osteogénico. La primera cadena de cDNA se sintetizó utilizando el First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham), y la expresión de los marcadores específicos de diferenciación osteogénica colágeno tipo I, osteopontin, osteocalcina, osterix y BMP-4 fueron evaluados mediante Q-RT-PCR utilizando SYBR Green PCR kit (Qiagen). La β-actina se utilizó como *housekeeping gene*. Las siguientes condiciones de PCR fueron utilizadas: 5 min a 94 ° C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 ° C seguido de 50 segundos a 60 ° C y 50 segundos a 72 ° C y una extensión final de 10 min a 72 ° C. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la Tabla 1S.

## 50 Ensayo tumorigénico *in vivo*.

Los ratones NOD/SCID IL2Rγ<sup>-/-</sup> (NSG) se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, MA). Todos los animales fueron alojados en condiciones libres de patógenos, alimentados *ad libitum* de acuerdo con las directrices de instalaciones para animales, desde las 8 hasta las 12 semanas de edad. Los ratones NSG han sido inoculados con  $5 \times 10^6$ -MSC,  $p53^{-/-}Rb^{-/-}$  MSC,  $5 \times 10^6$   $p53^{-/-}Rb^{-/-}$  MSC derivados de progenitores osteogénico ó  $2 \times 10^5$  de células *ex vivo* expandidos de tumores primarios, de acuerdo con las directrices del *United Kingdom*

*Coordinating Committee for Cancer Research* para el bienestar de los animales en la investigación experimental contra el cáncer. Los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron ~ 10 mm o 4 meses después de la infusión. Tras la extirpación del tumor, la mitad de los tumores se disintegraron mecánicamente para establecer líneas celulares de MSC *ex vivo* transformadas. La parte restante del tumor se utiliza para el análisis inmunohistopatológico.

### Perfiles de expresión génica (GEP)

Se recogieron células ASC y BM-MSc tanto primarias (wt, p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>), así como tumorales (TP53 y TRbp53) durante el crecimiento celular exponencial y se estabilizaron hasta la extracción de RNA. Se aisló el RNA utilizando el Agilent Total RNA Isolation Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), y su calidad fue comprobada en el Agilent 2100 Bioanalyzer. Las muestras de ARN total fueron marcadas con Cy3 utilizando el kit de marcaje rápido-Amp y se hibridó con el Microarray de la totalidad del genoma del ratón (G4122F), siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, CA). Cada muestra se etiquetó y se hibridó como triplica independiente. Los datos primarios se examinaron mediante el uso de software GeneSpring 11,0 (Silicon Genética, Redwood City, CA). La expresión de genes en los grupos control y experimental se compararon mediante la prueba t de Student y la corrección Benjamini Hochberg para múltiples pruebas. Solo los genes que satisfacen el umbral del valor de p < 0,05 y una expresión > 2 fueron incluidos y asignados como significativos. El análisis de las vías alteradas significativamente por la deficiencia de p53 o Rbp53 se realizó utilizando el software Ingenuity Pathway 8.0 (Ingenuity Systems, Inc., de Redwood City, CA). Los datos de microarrays se han depositado y está disponibles en Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

### Análisis inmunohistopatológico

Las muestras tumorales fueron fijadas en formol, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 4 micras, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) y un panel de anticuerpos primarios específicos (todos los de Upstate / Millipore): caldesmón (dilución 1:500), actina de músculo liso (dilución 1:50), desmina (dilución 1:500), la miosina (dilución 1:100). La secundaria HRP-conjugada de conejo anti-IgG fue utilizado en la dilución 1:100 durante 30 minutos. La inmunotinción fue visualizada utilizando diaminobenzidina y de contraste con hematoxilina. Todos los pasos de lavado se realizaron en PBS.

### Resultados

#### BM-MSc p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> dan lugar a leiomyosarcoma *in vivo*.

Recientemente se ha demostrado que la deficiencia en p53 sola o en combinación con Rb (Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>) en MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) promueve tumores leiomyosarcoma-like *in vivo*. Para determinar si existe un vínculo entre la fuente de las MSCs y el fenotipo del sarcoma, se generaron MSCs p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> de médula ósea (BM-MSCs). Se establecieron cultivos de BM-MSc de ratones wt, Rb<sup>loxP/loxP</sup>, p53<sup>loxP/loxP</sup> y Rb<sup>loxP/loxP</sup>p53<sup>loxP/loxP</sup>. Las BM-MSCs Rb<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> wt se generaron por la escisión de secuencias loxP usando vectores adenovirales expresando *Cre-recombinasa* (Ad-CMV-Cre) (**Fig. 1A**). La depleción de Rb y/o p53 en las BM-MSCs se confirmó por PCR genómica (**Fig. 1B**) y Western Blot (**Fig. 1C**). Como se esperaba, la expresión de Rb y p53 se incrementó tras el tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa I camptotecin. Los cultivos de BM-MSc, de manera similar a los de ASC, mostraron el fenotipo típico de antígenos de células mesenquimales independientemente del genotipo (**Fig. S1A**). Funcionalmente, las BM-MSCs p53<sup>-/-</sup> y especialmente las Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> mostraron una reducción del potencial de diferenciación adipogénico, mientras que la capacidad osteogénica fue reforzada en BM-MSCs Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (**Fig. S1B**).

Para el ensayo *in vivo* del potencial tumorigénico de los diferentes genotipos de BM-MSc, se inocularon ratones NOD/SCID-IL2Rγ<sup>-/-</sup> por vía subcutánea (s.c.) con wt o con BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>. De igual manera que los resultados obtenidos con ASCs p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>, las BM-MSc p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>, pero no las wt o las BM-MSc Rb<sup>-/-</sup> desarrollaron tumores *in vivo* (**Tabla 1**). Los tumores derivados de BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> mostraron una mayor penetrancia (75% vs 50%) y una latencia significativamente menor (65 frente a 107 días) que los tumores generados a partir de BM-MSc p53<sup>-/-</sup> (**Tabla 1** y la **Fig. 1D**). El análisis histológico de estos tumores los clasificó como tumores *leiomyosarcomas-like*, ya que se muestran las principales características de estos tumores de músculo liso, como los fascículos de células que se cortan en ~ 90 °, células alargadas que muestran hiper cromatismo y con pleomorfismo en núcleos aislados y células gigantes multinucleadas. Más importante aún, tumores derivados p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> se tiñeron positivo para los marcadores específicos de músculos lisos tales como α-actina de músculo liso (SMA) y caldesmón, pero fueron negativos para los marcadores de músculo esquelético, como la miosina (**Fig. 1E**). Por tanto, BM-MSc p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> inician la formación de leiomyosarcoma similar a ASCs p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (**Fig. S2**). Esto sugiere que al menos en el contexto de la desregulación del ciclo celular, el tejido fuente de las MSC indiferenciadas no parece determinar el fenotipo del sarcoma desarrollado *in vivo*.

**Tabla 1. Habilidad para la formación de tumor *In vivo* de BM-MSCs Wt, p53<sup>-/-</sup>, Rb<sup>-/-</sup>, Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> inoculadas en un ratón inmunodeficiente**

BM-MSC genotipo	Incidencia del tumor	Latencia	Análisis histológico
Wt	0/8	NT <sup>1</sup>	-
Rb <sup>-/-</sup>	0/9	NT <sup>1</sup>	-
p53 <sup>-/-</sup>	6/12*	65-148 (107) <sup>2</sup>	Leiomiomasarcoma
Rb <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup>	19/25*	31-109 (65) <sup>2</sup>	Leiomiomasarcoma

\*. Chi-square p-value<0.05 versus Wt o Rb<sup>-/-</sup> values.

1. NT, no se detectó tumor después de 150 días.

2. Rango de días para el desarrollo del tumor (media).

5 Para caracterizar mejor estos leiomiomasarcomas inducidos experimentalmente, tumores primarios derivados de  
 10 BM-MSC p53<sup>-/-</sup> (n=3) y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (n=3) se disgregaron mecánicamente y colocaron de nuevo en condiciones de  
 cultivo de MSC para establecer las líneas celulares inmortalizadas (TBM-p53-1 a -3 y TBM-1-Rbp53 a -3). Como  
 era de esperar, estas líneas celulares derivadas de tumores se mantuvieron deficientes para p53 y Rb (**Fig. S3A**)  
 y muestran una morfología y un inmunofenotipo idéntico a la BM-MSC parental. Para investigar su potencial  
 15 oncogénico, estas líneas celulares *ex-vivo* fueron inoculadas s.c. en ratones inmunodeficientes secundarios.  
 Todos los ratones trasplantados con líneas celulares ya sea Tbmp53 o TbmRbp53 desarrollaron tumores con  
 una penetrancia del 100% y un período de latencia mucho más corto (~ 2 semanas) que los tumores primarios  
 (**Fig. S3B**). El análisis histopatológico de estos tumores reveló que mantiene la morfología y el fenotipo de  
 leiomiomasarcoma, incluyendo la expresión de la SMA y caldesmón (**Fig. S3C**). Estos datos demuestran que los  
 tumores leiomiomasarcoma pueden ser trasplantados en serie, lo que indica la presencia de células iniciadoras de  
 leiomiomasarcoma dentro de las BM-MSC p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> indiferenciadas.

**El análisis de la expresión genética indica que la deficiencia en p53 o Rbp53 tanto en BM-MSC y el ASC promueve sarcomagénesis asociada a músculo.**

20 Independientemente del tejido de origen (BM o la grasa), MSC p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> inician leiomiomasarcoma *in vivo*,  
 como lo confirma el análisis histológico (**Fig. 1E** y **Fig. S2**). A continuación, en BM-MSC y ASCs p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>,  
 así como en líneas celulares derivadas *ex vivo* p53<sup>-/-</sup> (Tp53) y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (TRbp53) se realizó el análisis de la  
 expresión génica y se determinó si estas firmas parcialmente pueden reflejar un tipo particular de sarcoma.

25 Se generaron las listas de genes expresados diferencialmente (valor de p <0,05; expresión de > 2 veces arriba o  
 hacia abajo) entre los diferentes tipos celulares y sus correspondientes controles wt (wt-ASC o wt-BM-MSC).  
 Utilizando el software IPA se realizaron búsquedas de las funciones biológicas alteradas de manera significativa  
 con un enfoque especial sobre el cáncer. Entre los genes alterados en forma diferencial en las células deficientes  
 30 p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>, se seleccionaron aquellos clasificados por el software IPA como "relacionada con el sarcoma".  
 Curiosamente, los genes expresados diferencialmente (en comparación con wt) en las células primarias o  
 tumorales p53<sup>-/-</sup> y Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> deficientes, independientemente de su origen-BM o el tejido adiposo, se agruparon  
 principalmente por el software IPA como sarcomas asociados a músculo (miosarcoma, leiomiomasarcoma,  
 leiomiomatosis, tumorogénesis del músculo o rabiomasarcoma) y los genes expresados no diferencialmente se  
 35 agruparon como asociados a otro tipo de sarcoma (osteosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, etc) (**Fig. 2A** y  
**fig. S4**).

40 A continuación se comparó la firma de la expresión génica de las células tumorales TP53 derivados de ASC p53<sup>-/-</sup>  
 contra BM-MSC p53<sup>-/-</sup> y se encontró que muestran una similitud del 41% -62% en el número de genes  
 expresados diferencialmente entre TP53 y las células wt (**Fig. 2B**). Una superposición similar (39% -58%) se  
 encontró entre el TRbp53 derivado de ASC Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> y BM-MSC Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> (**Fig. 2B**). Esta superposición  
 grande en el perfil transcripcional apoya el diagnóstico histológico y confirma que la deficiencia de p53 o Rbp53  
 tanto en BM-MSC como en ASC indiferenciadas promueve leiomiomasarcoma similar *in vivo*.

45 Por último, con el fin de obtener conocimientos sobre las vías de señalización que pueden contribuir al desarrollo  
 de leiomiomasarcoma, se seleccionaron los genes comúnmente alterados en las células TP53 y TRbp53 que se  
 asociaron a leiomiomasarcoma por el software IPA. Se han encontrado pocos genes alterados en exclusiva, ya sea  
 en células TP53 o TRbp53 (**Fig. 2C**). En contraste, la mayoría de los genes fueron alterados comúnmente tanto  
 en células TP53 como TRbp53 (**Fig. 2C**), afectando vías de señalización claves tales como las vías de

señalización NF- $\kappa$ B, PTEN, IL-8 y PI3K/AKT (**Fig. 2C**). Por lo tanto, la desregulación de estas vías de señalización podría estar en la base de la patogénesis leiomiocarcinoma en estos modelos tumorales experimentales.

##### 5 La depleción de Rb y p53 en los progenitores osteogénicos de BM-MSc conduce al desarrollo de osteosarcoma *in vivo*.

La fuente tisular de las MSC no parece determinar el fenotipo de desarrollo del sarcoma *in vivo* como se sugiere por el hecho de que la deficiencia de Rb y p53 en ASC o BM-MSc indiferenciadas da lugar al mismo tumor - leiomiocarcinoma. Sin embargo, existe la hipótesis de que la célula de origen de los osteosarcomas podría ser un linaje osteogénico de células progenitoras comprometidas en lugar de MSC no diferenciadas, y que los mismos eventos oncogénicos podrían desencadenar sarcomas de fenotipo diferente dependiendo de la etapa de diferenciación / desarrollo de las MSCs. Por lo tanto, para analizar si el estadio de diferenciación de las BM-MSc puede definir el fenotipo del sarcoma, BM-MSc Rb<sup>loxP/loxP</sup>p53<sup>loxP/loxP</sup> fueron inducidas a diferenciarse hacia el linaje osteogénico, y ambos genes Rb y p53 fueron excididos mediante Ad-CMV-Cre en las diferentes etapas (día 0, 2, 5 y 10) a lo largo de la diferenciación osteogénica (**Fig. 3A**).

La depleción de Rb y p53 en BM-MSc indiferenciada y en sus derivados osteogénicos fue confirmada por PCR genómica (**Fig. 3B**). La diferenciación osteogénica gradual *in vitro* fue supervisado por q-RT-PCR mediante el análisis de varios factores osteogénicos específicos tales como osterix, BMP4, osteopontina, el colágeno tipo I y la osteocalcina (**Fig. 3C**). Asimismo, la diferenciación osteogénica apropiada se confirmó funcionalmente a través de la detección de la deposición de calcio osteogénico asociada por tinción con rojo de alizarina (**Fig. 3D**).

El potencial oncogénico de la depleción de Rb y de p53 después de 0, 2, 5 y 10 días de diferenciación osteogénica se evaluó mediante la inoculación s.c. en ratones NOD/SCID IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Todas las BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> iniciaron tumores *in vivo*, independientemente de su etapa de diferenciación, con una incidencia similar (entre 70% y 80%) y latencia (que va de 62 a 68 días) (**Tabla 2** y **Fig. 4A**). Como era de esperar, BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> indiferenciadas iniciaron tumores *leiomiocarcinoma-like* (**Fig. 1** y **Fig. 4B**). Sin embargo, los tumores formados por células progenitoras osteogénicas diferenciadas durante 2, 5 o 10 días seguidos de la depleción de p53 y de Rb consistentemente muestran claros rasgos histológicos de osteosarcoma, incluyendo áreas extensas de células eosinófilas de material osteoide que contienen células embebidas en la matriz, así como algunas áreas de hueso bien formado (**Fig. 4B**). Sorprendentemente, la depleción de Rb y p53 en derivados osteogénicos más comprometidos formó tumores *osteosarcoma-like*, con estructuras más diferenciadas que en derivados osteogénicos menos diferenciados (**Fig. 4B**). Por lo tanto, los osteosarcomas formados por BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> diferenciados hacia los progenitores osteogénicos por 2 días presentan áreas de matriz osteoide que se convirtieron en mucho más denso en los tumores formados por BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> diferenciados hacia el linaje osteogénico durante 5 o 10 días que desarrollaron áreas de hueso bien formado inmaduro (**Fig. 4B**). Estos datos sugieren que la etapa de diferenciación de BM-MSc impone el fenotipo de desarrollo *in vivo* del sarcoma.

**Tabla 2. Habilidad para la formación del tumor *in vivo* de los progenitores osteogénicos de BM-MSc Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>**

BM-MSCs Rb <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup>	Incidencia del tumor	Latencia	Análisis histológico
Indiferenciada	19/25	31-109 (65) <sup>1</sup>	Leiomiocarcinoma
2 Días Osteo Medium + Ad-Cre	11/15	35-100 (63) <sup>1</sup>	Osteosarcoma
5 Días Osteo Medium + Ad-Cre	12/15	22-107 (62) <sup>1</sup>	Osteosarcoma
10 Días Osteo Medium + Ad-Cre	14/20	38-97 (68) <sup>1</sup>	Osteosarcoma

1. Rango de días para el desarrollo del tumor (media)

40

A fin de probar si el desarrollo de tumores como el osteosarcoma se asocia a la deficiencia específica de Rb y p53 en BM-MSc, se realizaron experimentos con ASCs Rb<sup>loxP/loxP</sup>p53<sup>loxP/loxP</sup> idénticas (**Fig. 5SA**). La depleción de Rb y p53 en las ASC indiferenciadas y sus derivados osteogénicos (progenitores osteogénicos) fue confirmada por PCR genómica (**Fig. 5SB**). La diferenciación osteogénica gradual *in vitro* fue supervisada por q-RT-PCR mediante el análisis de varios factores específicos osteogénicos tales como osterix, BMP4, la osteopontina y la osteocalcina (**Fig. 5SC**) y funcionalmente confirmado a través de la detección de depósitos de calcio osteogénico asociada a la tinción con rojo de alizarina (**Fig. 5SD**). Las ASCs Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> indiferenciadas dieron lugar a tumores *leiomiocarcinoma-like in vivo* (**Tabla 2S** y **Fig. 2S**), mientras que ASC Rb<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup> derivadas a progenitores

45

5 osteogénicos no desarrollaron tumores cuando se inocula en ratones NOD/SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ , incluso 130 días después de la inoculación (**Tabla 2S**). Estos datos indican que los progenitores osteogénicos diferenciados de MSC a partir de fuentes distintas de tejido no necesariamente muestran un potencial de transformación similar, y que los progenitores osteogénicos diferenciados de BM-MSCs en lugar de las BM-MSCs indiferenciadas, ASCs indiferenciadas o progenitores osteogénicos derivados de ASCs, parecen ser la célula de origen para el desarrollo de osteosarcoma, al menos cuando los reguladores del ciclo celular Rb y p53 están desregulados.

**Tabla S2. Habilidad para la formación del tumor *in vivo* de los derivados osteogénicos de ASC Rb $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$**

ASCs Rb $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$	Incidencia del tumor	Latencia	Análisis histológico
Indiferenciada	3/5	51-58 (56) <sup>1</sup>	Leiomiomasarcoma
2 Días Osteo Medium + Ad-Cre	0/5	NT	-
5 Días Osteo Medium + Ad-Cre	0/5	NT	-
10 Días Osteo Medium + Ad-Cre	0/5	NT	-

1. Rango de días para el desarrollo del tumor (media)  
 1. NT, No se detectó tumor después de 120 días.

10

**Las líneas celulares establecidas *ex vivo* a partir de osteosarcoma primario reinician el desarrollo de osteosarcoma agresivo en los receptores secundarios**

15

Para determinar si estos osteosarcomas inducidos experimentalmente pueden ser serialmente trasplantados en serie, los tumores primarios formados a partir de BM-MSCs Rb $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$  derivados a progenitores osteogénicos diferenciados por 2 y 10 días, así como de BM-MSCs Rb $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$  indiferenciadas, se disgregaron mecánicamente y colocaron de nuevo en condiciones de cultivo de MSCs para establecer líneas celulares inmortalizadas (TbmRbp53-2 días, TbmRbp53- 10 días y TbmRbp53-Undiff –indiferenciadas-). Como era de esperar, estas líneas celulares derivadas de tumores permanecieron deficientes para Rb y p53 (**Fig. 5A**). Todas las líneas de células fueron capaces de generar tumores *in vivo* con una penetrancia del 100% y con un corto período de latencia de 18-35 días (**Fig. 5B**). El análisis histopatológico de los tumores secundarios generados a partir de TbmRbp53-2 días y TbmRbp53- 10 días, reveló que mantuvieron las principales características de los osteosarcomas primarios, incluyendo la presencia de grandes áreas de matriz osteoide mientras que los tumores secundarios derivados de TbmRbp53-Undiff conserva el fenotipo leiomiomasarcoma (**Fig. 5B**). Estos datos demuestran que el fenotipo *osteosarcoma-like* puede ser trasplantados en serie, indicando la presencia de células iniciadoras de osteosarcoma de dentro de los progenitores osteogénicos Rb $^{-/-}$ p53 $^{-/-}$  diferenciados de las BM-MSCs.

20

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Una célula madre mesenquimal aislada, procedente de médula ósea, diferenciada a progenitor osteogénico, modificada genéticamente y con capacidad de originar un osteosarcoma, que comprende la delección de las secuencias o de un fragmento de las secuencias que codifican la proteína p53 y la proteína Rb.
- 10 2.- La célula madre mesenquimal aislada según la reivindicación anterior, donde la secuencia delecionada que codifica a la proteína p53 es la SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.
- 15 3.- La célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la secuencia delecionada que codifica a la proteína Rb es la SEQ ID NO: 3, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.
- 4.- La célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la célula madre ha sido aislada de un mamífero.
- 20 5.- Una línea celular derivada de una célula aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 6.- Una población celular que comprende al menos una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 7.- La población celular según la reivindicación anterior que comprende, al menos, un 90% de células según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 8.- Una composición que comprende al menos una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una línea celular según la reivindicación 5, o una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 6-7.
- 9.- Una composición según la reivindicación 8, que es una composición farmacéutica.
- 30 10.- Un mamífero no humano que comprende al menos una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una línea celular según la reivindicación 5, una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-9.
- 35 11.- El mamífero no humano según la reivindicación anterior, donde la célula, la línea celular, la población celular o la composición han sido implantadas subcutáneamente.
- 12.- El mamífero no humano según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde el mamífero es un ratón.
- 40 13.- El mamífero no humano según la reivindicación anterior, que es un ratón NOD/SCID IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup>.
- 14.- El uso de al menos una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una línea celular según la reivindicación 5, una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o un modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, para la detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del sarcoma.
- 45 15.- El uso de al menos una célula, la línea celular, la población celular, la composición o el modelo animal según la reivindicación anterior, donde el sarcoma es un osteosarcoma.
- 50 16.- Un método de detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del sarcoma que comprende:
- 55 a) poner en contacto o administrar el agente a testar a una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una línea celular según la reivindicación 5, una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, o un modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, y
- b) determinar si el agente a testar inhibe la capacidad proliferativa y oncogénica de las células tumorales.
- 17.- El método según la reivindicación anterior, donde el sarcoma es un osteosarcoma.
- 60 18.- Un kit o dispositivo que comprende al menos una célula según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, una línea celular según la reivindicación 5, una población celular según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-9.
- 19.- El uso del kit según la reivindicación anterior, para la detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del sarcoma.
- 65

- 20.- El uso del kit según la reivindicación anterior, para la detección de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del osteosarcoma.
- 5 21.- Un método de obtención de progenitores osteogénicos con capacidad de originar un osteosarcoma, que comprende:
- a) cultivar células madre mesenquimales procedentes de médula ósea en un medio de diferenciación osteogénica hasta obtener un progenitor osteogénico, y
  - b) delecionar la secuencia que codifica la proteína p53 y la secuencia que codifica la proteína Rb de un progenitor osteogénico de (a).
- 10 22.- El método de obtención de progenitores osteogénicos con capacidad de originar un osteosarcoma según la reivindicación anterior, donde la secuencia delecionada que codifica a la proteína p53 es la SEQ ID NO: 1, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.
- 15 23.- El método de obtención de progenitores osteogénicos con capacidad de originar un osteosarcoma según cualquiera de las reivindicaciones 21-22, donde la secuencia delecionada que codifica a la proteína Rb es la SEQ ID NO: 3, o cualquiera de sus variantes o fragmentos biológicamente activos.
- 20 24.- El método de obtención de progenitores osteogénicos con capacidad de originar un osteosarcoma según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, que además comprende:
- c) implantar un progenitor osteogénico obtenible por el método de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en un mamífero no humano según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, para inducir un tumor primario,
  - d) disgregar mecánicamente el tumor primario de (c), y
  - e) cultivar el tumor primario en medios de cultivo de MSCs para establecer líneas celulares inmortalizadas.
- 25 25.- Progenitor osteogénico con capacidad de originar un osteosarcoma obtenible por un método según cualquiera de las reivindicaciones 21-23.
- 30 26.- Línea celular inmortalizada obtenible por un método según cualquiera de las reivindicaciones 21-24.

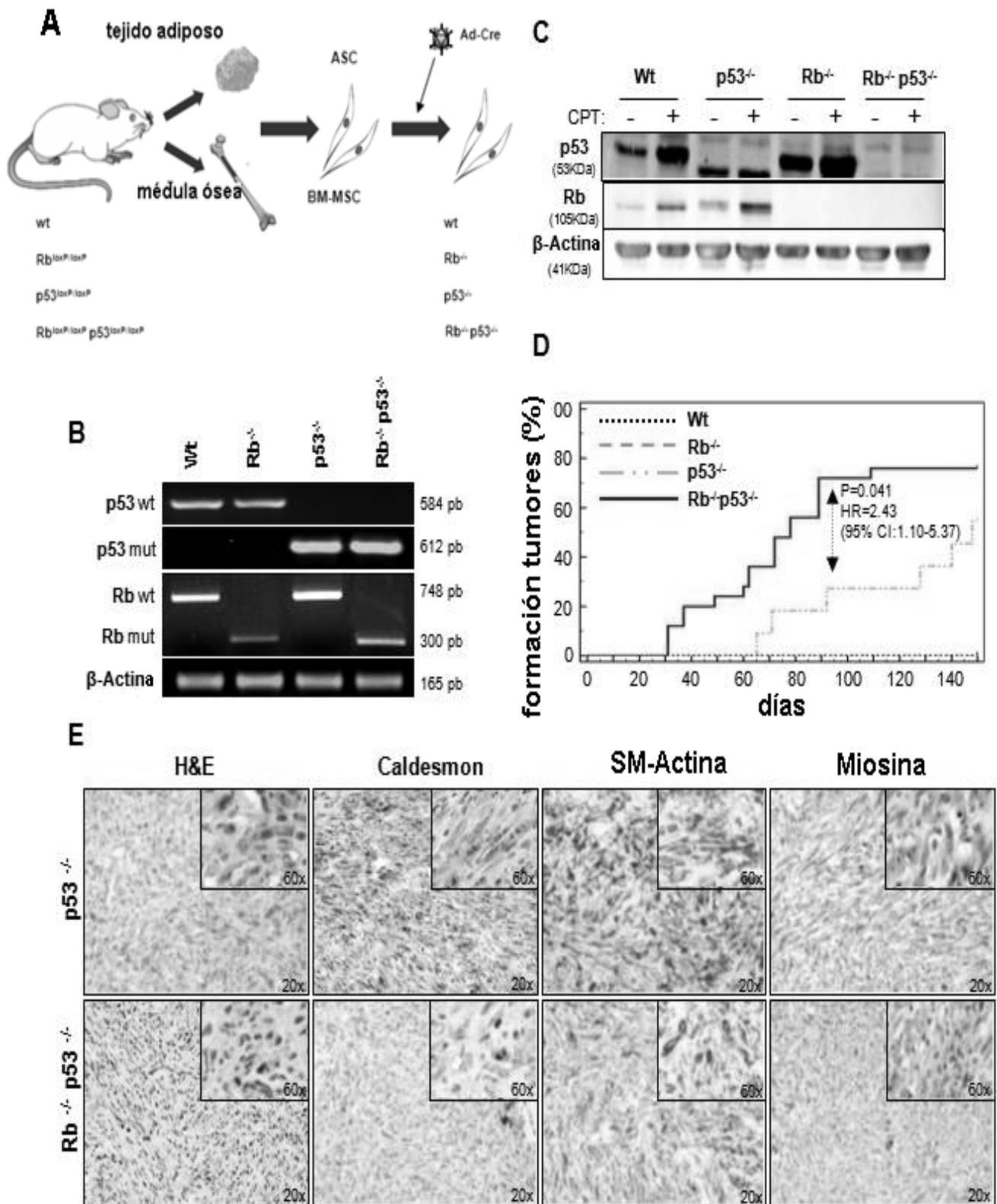


Fig. 1

A

	Categorías de Sarcoma	p-Valor	Moléculas
p53 vs wt	miosarcoma	4,68E-04	19
	GRASA sarcoma	6,15E-04	29
	rabdomiosarcoma	1,01E-03	18
	tumorogénesis del músculo	1,58E-03	7
	tumorogénesis del músculo	2,95E-04	8
	BM hiperplasia muscular desarrollo del sarcoma	9,98E-04 7,87E-03	7 6
Rbp53 vs wt	GRASA sarcoma	4,44E-06	101
	leiomiomatosis	2,90E-05	98
	miosarcoma	2,70E-10	41
	BM sarcoma sarcoma del tejido blando rabdomiosarcoma	2,61E-09 7,60E-09 1,76E-08	78 51 31
Tp53 vs wt	GRASA leiomiomatosis	4,39E-07	134
	miosarcoma	1,44E-04	53
	leiomiosarcoma	4,21E-04	22
	BM miosarcoma sarcoma leiomiosarcoma	1,15E-04 3,17E-04 5,86E-04	40 87 17
TRbp53 vs wt	GRASA leiomiomatosis	6,22E-07	113
	sarcoma miosarcoma	5,15E-05 1,88E-04	105 45
	BM sarcoma del tejido blando leiomiomatosis	1,63E-04 2,13E-04	86 142

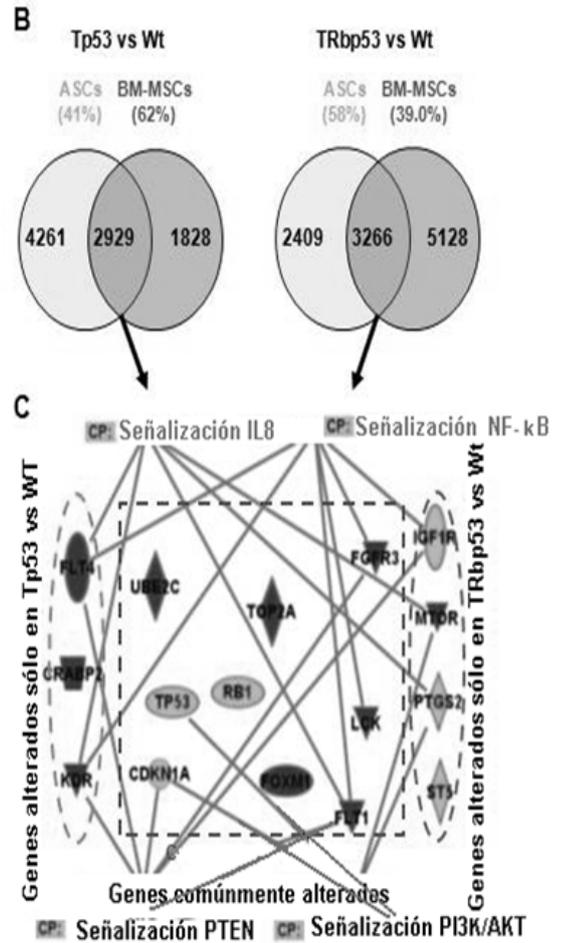


Fig. 2

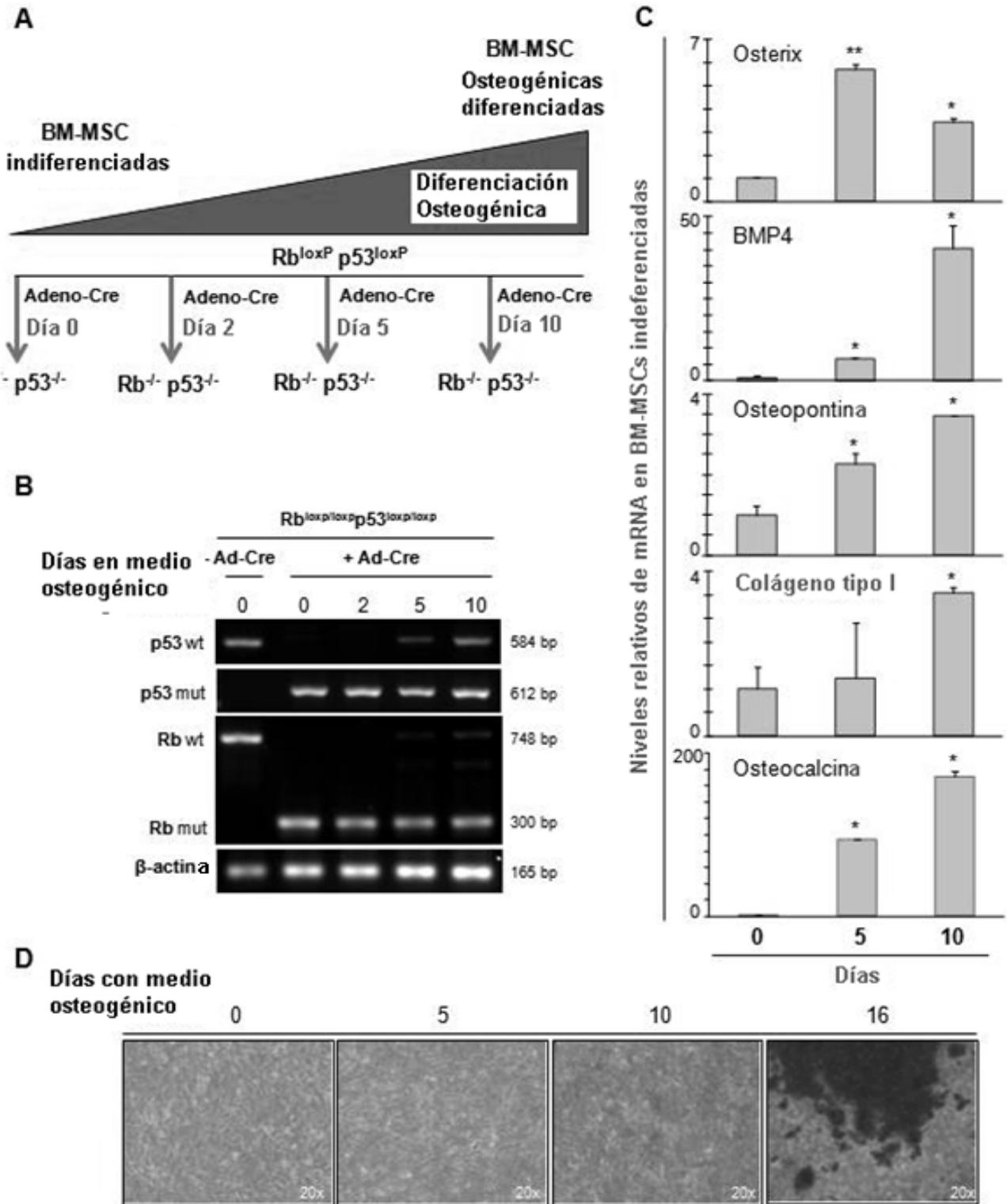


Fig. 3

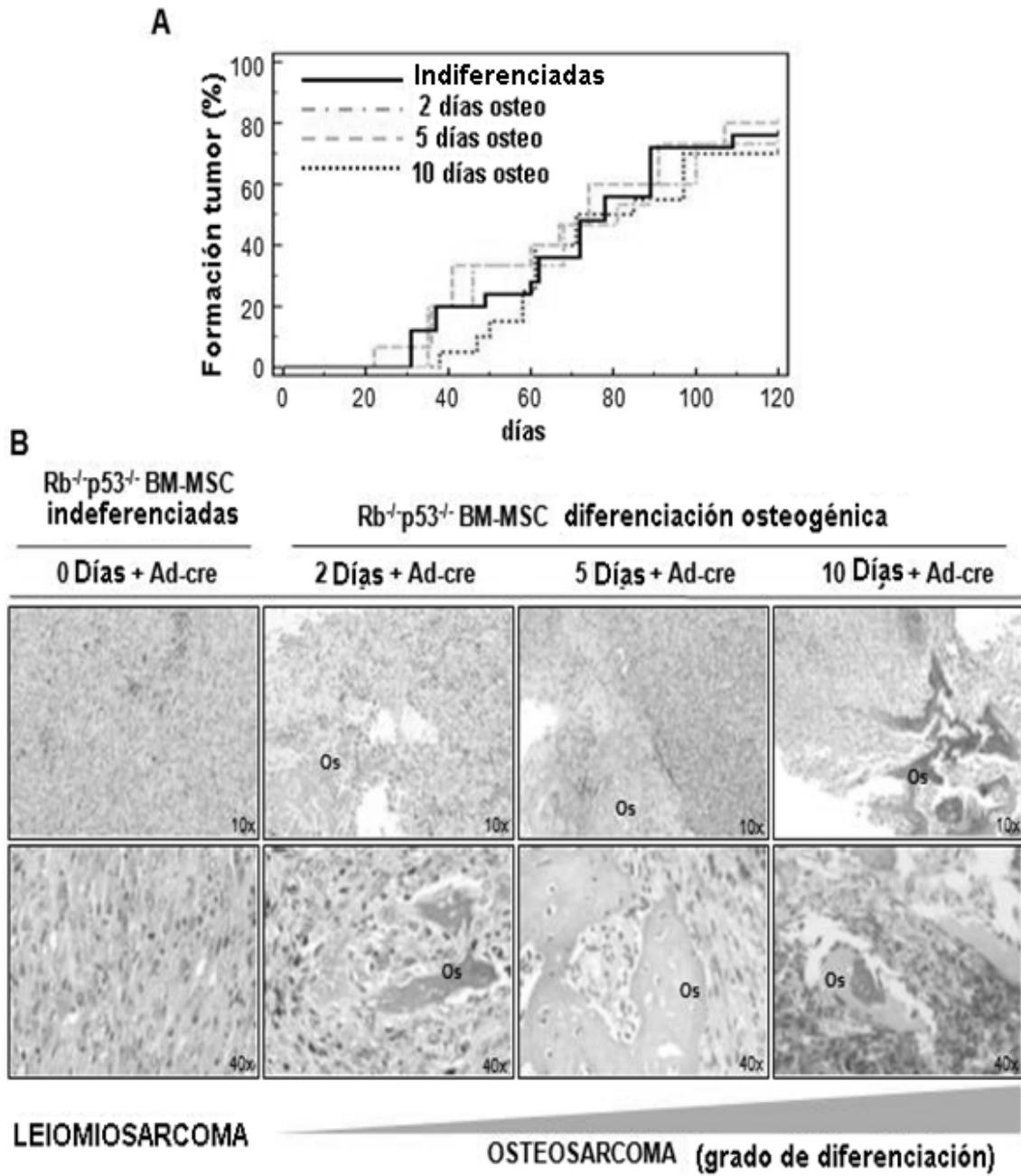


Fig. 4

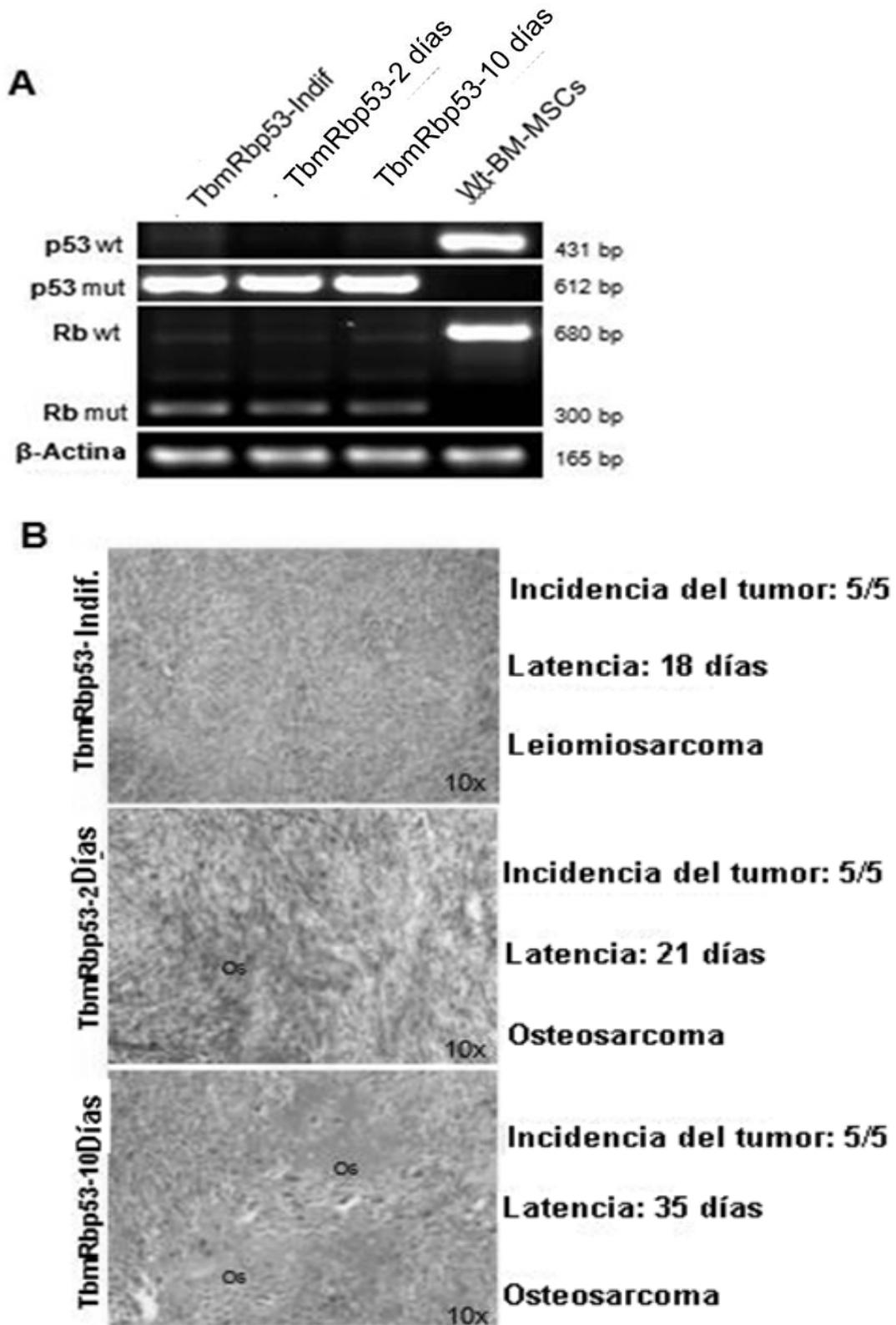


Fig.5

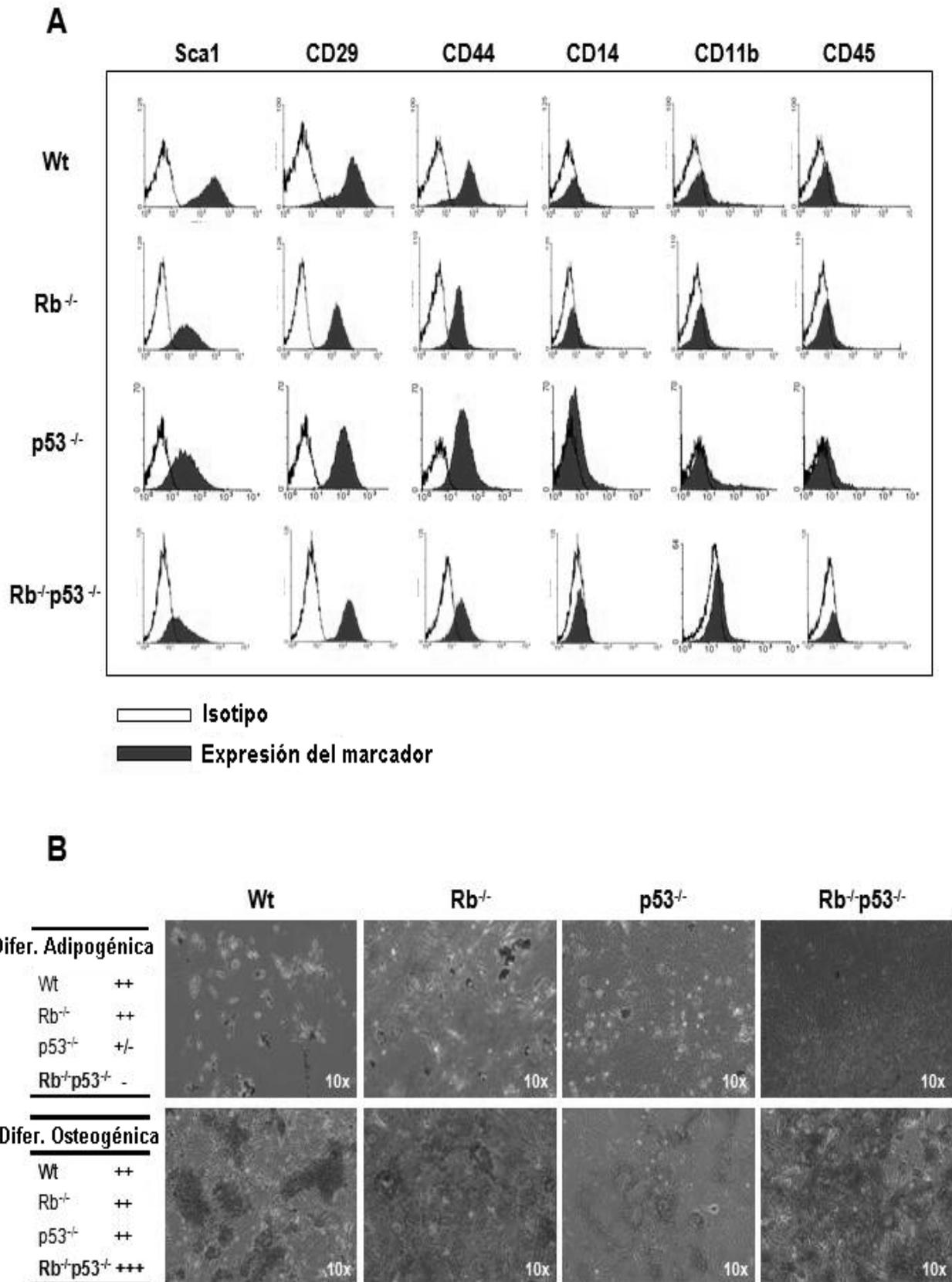


Fig.1S

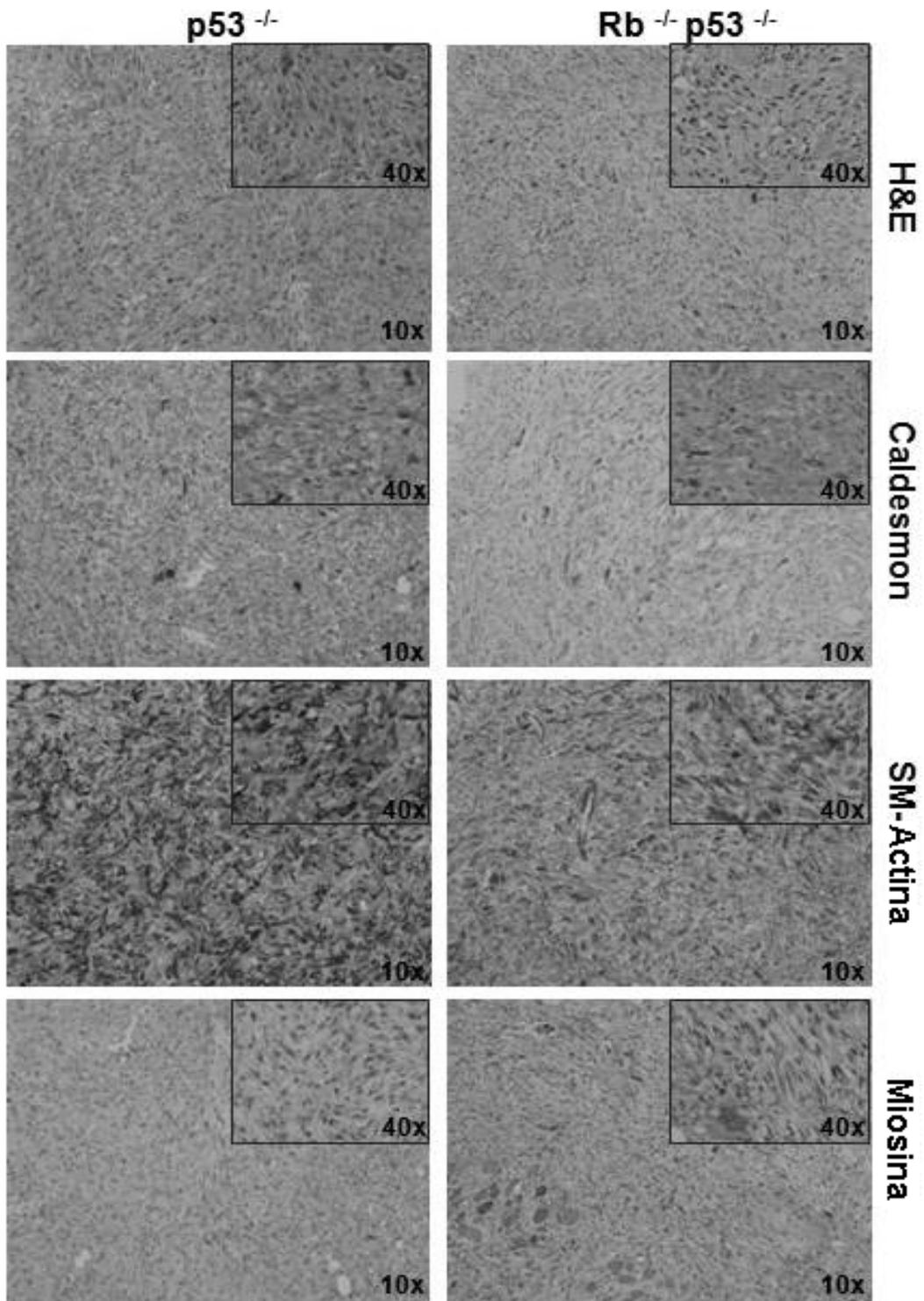
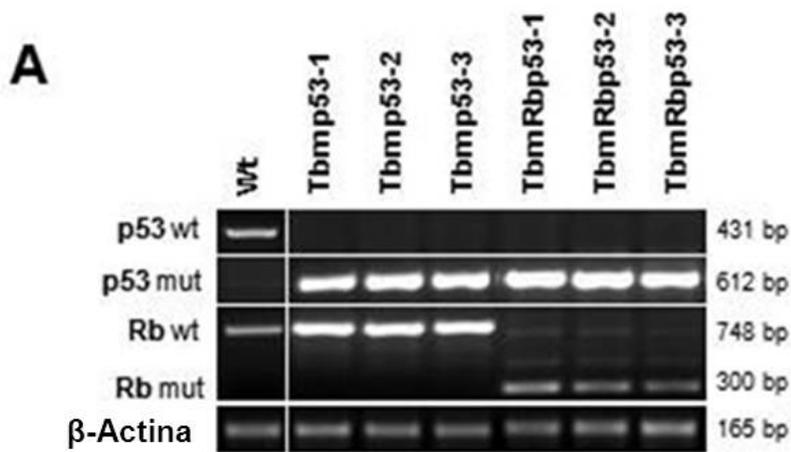


Fig. 2S



**B**

MSC Tumoral	Incidencia secundaria de tumores	Latencia
p53 <sup>-/-</sup>	6/6	16*
Rb <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup>	6/6	17*

+nt. No se detectó tumor  
\* Días para el desarrollo de tumores

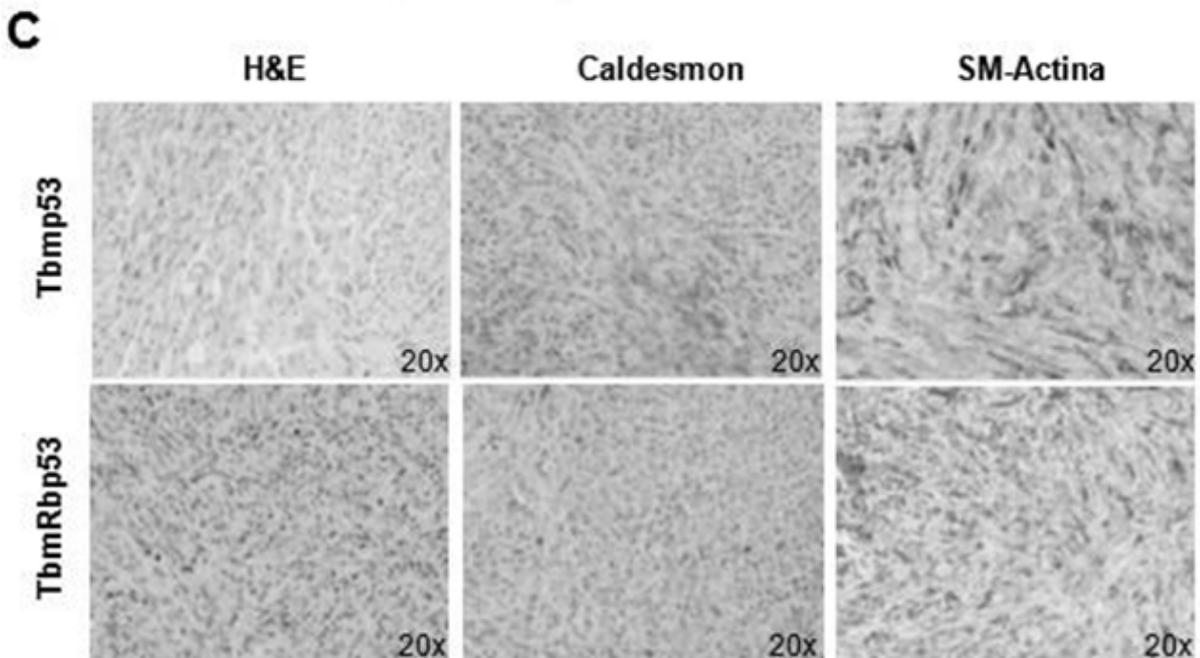


Fig. 3S





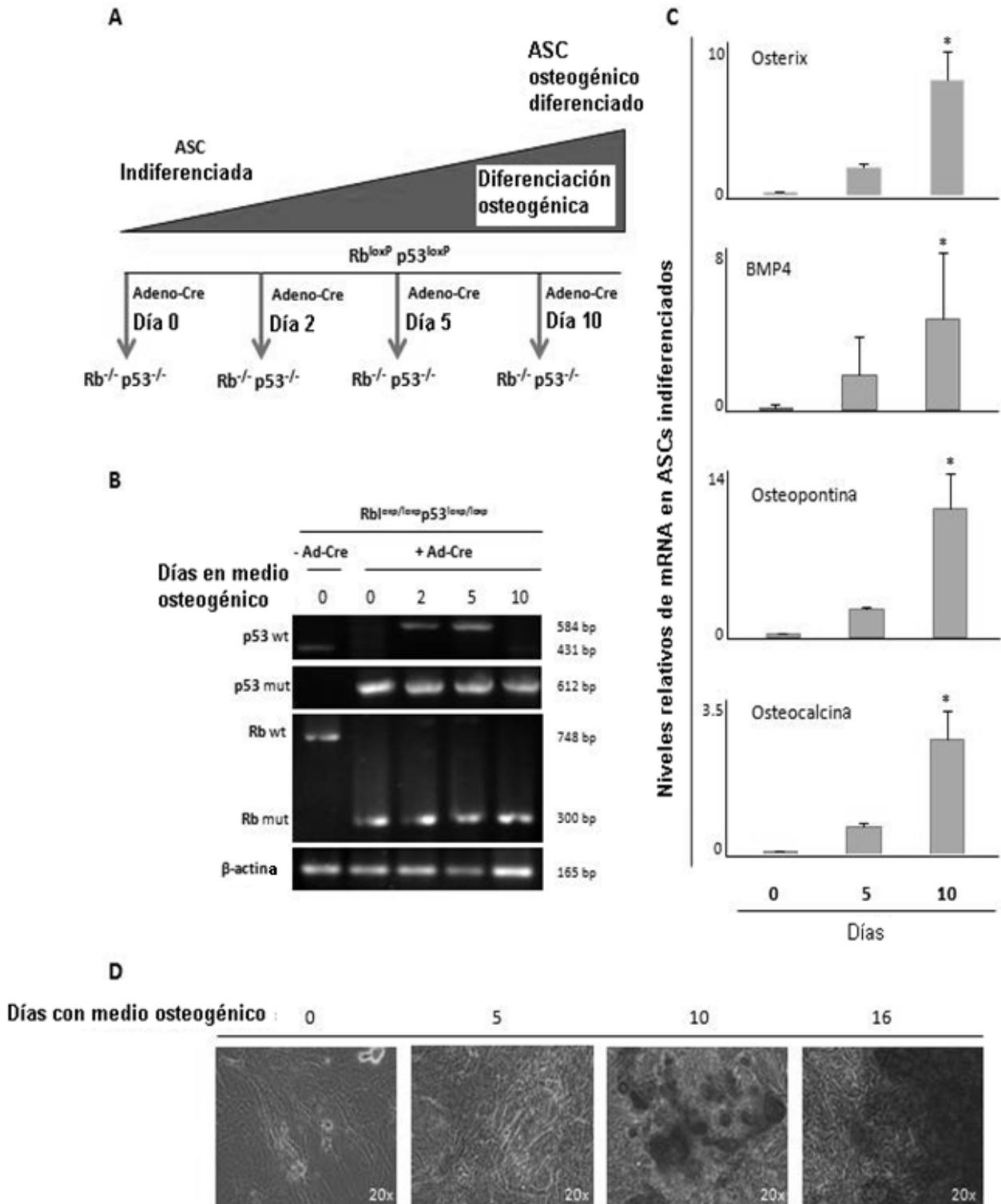


Fig. 5S

# ES 2 440 371 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud

<120> Células, líneas celulares y modelo animal no humano, para la determinación de agentes terapéuticos

<130> P-05619

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2588

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
gatgggattg gggttttccc ctcccatgtg ctcaagactg gcgctaaaag ttttgagctt      60
ctcaaaagtc tagagccacc gtccagggag caggtagctg ctgggctccg gggacacttt      120
gcgttcgggc tgggagcgtg ctttccacga cggtgacacg cttccctgga ttggccagac      180
tgccttccgg gtcactgcca tggaggagcc gcagtcagat cctagcgtcg agccccctct      240
gagtcaggaa acatthttcag acctatggaa actacttctt gaaaacaacg ttctgtcccc      300
cttgccgtcc caagcaatgg atgatttgat gctgtccccg gacgatattg aacaatggtt      360
cactgaagac ccaggtccag atgaagctcc cagaatgcc a gaggctgctc cccccgtggc      420
ccctgcacca gcagctccta caccggcggc ccctgcacca gccccctcct ggccccctgtc      480
atcttctgtc ctttcccaga aaacctacca gggcagctac ggtttccgtc tgggcttctt      540
gcattctggg acagccaagt ctgtgacttg cacgtactcc cctgccctca acaagatgtt      600
ttgccaactg gccaaagact gccctgtgca gctgtggggtt gattccacac ccccgcccgg      660
caccgcgctc cgcgccatgg ccatctaaa gcagtcacag cacatgacgg aggttgtgag      720
gcgctgcccc caccatgagc gctgctcaga tagcgatggt ctggccccctc ctgagcatct      780
tatccgagtg gaaggaaatt tgcgtgtgga gtatttggat gacagaaaca cttttcgaca      840
tagtgtggtg gtgccctatg agccgctga ggttggctct gactgtacca ccatcacta      900
caactacatg tgtaacagtt cctgcatggg cggcatgaac cggaggccca tcctcaccat      960
catcactctg gaagactcca gtggaatct actgggacgg aacagctttg aggtgctgtg      1020
ttgtgctgt cctgggagag accggcgcac agaggaagag aatctccgca agaaagggga      1080
gcctcaccac gagctgcccc caggagcac taagcgagca ctgcccaca acaccagctc      1140
ctctccccag ccaagaaga aaccactgga tggagaatat ttcacccttc agatccgtgg      1200
```

# ES 2 440 371 A1

```

gcgtgagcgc ttcgagatgt tccgagagct gaatgaggcc ttggaactca aggatgccca      1260
ggctgggaag gagccagggg ggagcagggc tctactccagc cacctgaagt ccaaaaaggg      1320
tcagtctacc tcccgccata aaaaactcat gttcaagaca gaagggcctg actcagactg      1380
acattctcca cttcttggtc cccactgaca gcctcccacc cccatctctc cctcccctgc      1440
cattttgggt tttgggtctt tgaacccttg cttgcaatag gtgtgcgta gaagcaccca      1500
ggacttccat ttgctttgtc cggggctcc actgaacaag ttggcctgca ctggtgtttt      1560
gttgtgggga ggaggatggg gagtaggaca taccagctta gattttaagg tttttactgt      1620
gagggatggt tgggagatgt aagaaatggt cttgcagtta agggttagtt tacaatcagc      1680
cacattctag gtaggggccc acttcacgt actaaccagg gaagctgtcc ctcactgttg      1740
aattttctct aacttcaagg cccatatctg tgaaatgctg gcatttgcac ctacctaca      1800
gagtgcattg tgaggggtaa tgaataatg tacatctggc cttgaaacca cctttatta      1860
catggggtct agaacttgac cccttgagg gtgcttggtc cctctccctg ttggtcggtg      1920
ggttggtagt ttctacagtt gggcagctgg ttaggtagag ggagttgtca agtctctgct      1980
ggcccagcca aaccctgtct gacaacctct tgggtgaacct tagtacctaa aaggaaatct      2040
caccccatcc cacaccctgg aggatttcat ctcttgata tgatgatctg gatccaccaa      2100
gacttgtttt atgctcaggg tcaatttctt tttctttttt tttttttttt tttctttttc      2160
tttgagactg ggtctcgctt tgttgccag gctggagtgg agtggcgtga tcttggctta      2220
ctgcagcctt tgctccccg gctcgagcag tctgcctca gcctccggag tagctgggac      2280
cacaggttca tgccaccatg gccagccaac ttttgcattg tttgtagaga tggggtctca      2340
cagtgttgcc caggctggtc tcaaactcct gggctcaggc gatccacctg tctcagcctc      2400
ccagagtgct gggattacaa ttgtgagcca ccacgtccag ctggaagggt caacatcttt      2460
tacattctgc aagcacatct gcattttcac cccacccttc ccctccttct ccctttttat      2520
atcccatttt tatatcgatc tcttatttta caataaaact ttgctgccac ctgtgtgtct      2580
gaggggtg                                          2588

```

```

<210> 2
<211> 393
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2

```

# ES 2 440 371 A1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu  
 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp  
 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro  
 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro  
 65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser  
 85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly  
 100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro  
 115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln  
 130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met  
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys  
 165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln  
 180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp  
 195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu  
 210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser  
 225 230 235 240

# ES 2 440 371 A1

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr  
 245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val  
 260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn  
 275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr  
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys  
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu  
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp  
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His  
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met  
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp  
 385 390

<210> 3  
 <211> 4772  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3 gctcagttgc cgggcggggg agggcgcgtc cggtttttct caggggacgt tgaaattatt	60
tttgtaacgg gagtcgggag aggacggggc gtgccccgac gtgcgcgcgc gtcgtcctcc	120
ccggcgtcc tccacagctc gctggctccc gccgcggaaa ggcgtcatgc cgccaaaac	180
ccccgaaaa acggccgcca ccgccgcgc tgccgccgcg gaacccccgg caccgccc	240
gccgcccct cctgaggagg acccagagca ggacagcggc ccggaggacc tgctctcgt	300

## ES 2 440 371 A1

caggcttgag tttgaagaaa cagaagaacc tgattttact gcattatgtc agaaattaa	360
gataccagat catgtcagag agagagcttg gttaacttgg gagaaagttt catctgtgga	420
tggagtattg ggaggttata ttcaaaagaa aaaggaactg tggggaatct gtatctttat	480
tgcagcagtt gacctagatg agatgtcgtt cacttttact gagctacaga aaaacataga	540
aatcagtgtc cataaattct ttaacttact aaaagaaatt gataccagta ccaaagttga	600
taatgctatg tcaagactgt tgaagaagta tgatgtattg tttgcactct tcagcaaatt	660
ggaaaggaca tgtgaactta tatatttgac acaaccagc agttcgatat ctactgaaat	720
aaattctgca ttggtgctaa aagtttcttg gatcacattt ttattagcta aaggggaagt	780
attacaaatg gaagatgatc tggtgatttc atttcagtta atgctatgtg tccttgacta	840
ttttattaa ctctcacctc ccatgttgct caaagaacca tataaaacag ctgttatacc	900
cattaatggt tcacctcgaa caccaggcg aggtcagaac aggagtgcac ggatagcaaa	960
acaactagaa aatgatacaa gaattattga agttctctgt aaagaacatg aatgtaatat	1020
agatgaggtg aaaaatgttt atttcaaaaa ttttatacct tttatgaatt ctcttgact	1080
tgtaacatct aatggacttc cagaggttga aaatctttct aaacgatacg aagaaattta	1140
tcttaaaaat aaagatctag atgcaagatt atttttggat catgataaaa ctcttcagac	1200
tgattctata gacagttttg aaacacagag aacaccacga aaaagtaacc ttgatgaaga	1260
ggtgaatgta attcctccac aactccagt taggactggt atgaacacta tccaacaatt	1320
aatgatgatt ttaaattcag caagtgatca accttcagaa aatctgattt cctattttta	1380
caactgcaca gtgaatccaa aagaaagtat actgaaaaga gtgaaggata taggatacat	1440
ctttaagag aaatttgcta aagctgtggg acagggttgt gtcgaaattg gatcacagcg	1500
atacaaactt ggagttcgct tgtattaccg agtaatggaa tccatgctta aatcagaaga	1560
agaacgatta tccattcaaa attttagcaa acttctgaat gacaacattt ttcatatgtc	1620
tttattggcg tgcgctcttg aggttgtaat ggccacatat agcagaagta catctcagaa	1680
tcttgattct ggaacagatt tgtctttccc atggattctg aatgtgctta atttaaagc	1740
ctttgatttt taaaaagtga tcgaaagttt tatcaaagca gaaggcaact tgacaagaga	1800
aatgataaaa catttagaac gatgtgaaca tcgaatcatg gaatcccttg catggctctc	1860
agattcacct ttatttgatc ttattaaaca atcaaaggac cgagaaggac caactgatca	1920
ccttgaatct gcttgcctc ttaatcttcc tctccagaat aatcacactg cagcagatat	1980
gtatctttct cctgtaagat ctcaaagaa aaaaggttca actacgcgtg taaattctac	2040

## ES 2 440 371 A1

tgcaaatgca gagacacaag caacctcagc cttccagacc cagaagccat tgaaatctac	2100
ctctctttca ctgttttata aaaaagtgta tgggctagcc tatctccggc taaatacact	2160
ttgtgaacgc cttctgtctg agcaccaga attagaacat atcatctgga cccttttcca	2220
gcacaccctg cagaatgagt atgaactcat gagagacagg catttgacc aaattatgat	2280
gtgttccatg tatggcatat gcaaagtgaa gaatatagac cttaaattca aaatcattgt	2340
aacagcatac aaggatcttc ctcatgctgt tcaggagaca ttcaaactg ttttgatcaa	2400
agaagaggag tatgattcta ttatagtatt ctataactcg gtcttcatgc agagactgaa	2460
aacaaatatt ttgcagtatg cttccaccag gccccctacc ttgtcaccaa tacctcacat	2520
tcctcgaagc cttacaagt ttctagttc acccttacgg attcctggag ggaacatcta	2580
tatttcacc ctgaagagtc catataaaat ttcagaaggt ctgccaacac caacaaaaat	2640
gactccaaga tcaagaatct tagtatcaat tgggtaatca ttcgggactt ctgagaagtt	2700
ccagaaaata aatcagatgg tatgtaacag cgaccgtgtg ctcaaaagaa gtgctgaagg	2760
aagcaaccct cctaaaccac tgaaaaaact acgctttgat attgaaggat cagatgaagc	2820
agatggaagt aaacatctcc caggagagtc caaatctcag cagaaactgg cagaaatgac	2880
ttctactcga acacgaatgc aaaagcagaa aatgaatgat agcatggata cctcaaacia	2940
ggaagagaaa tgaggatctc aggaccttgg tggacactgt gtacacctct ggattcattg	3000
tctctcacag atgtgactgt ataactttcc caggttctgt ttatggccac atttaatatc	3060
ttcagctctt tttgtggata taaaatgtgc agatgcaatt gtttgggtga ttcttaagcc	3120
acttgaaatg ttagtcattg ttatttatac aagattgaaa atcttgtgta aatcctgcca	3180
tttaaaaagt tgtagcagat tgtttctct tccaaagtaa aattgctgtg ctttatggat	3240
agtaagaatg gccctagagt gggagtcctg ataaccagg cctgtctgac tactttgcct	3300
tctttttag catataggtg atgtttgctc ttgtttttat taatttatat gtatattttt	3360
ttaatttaac atgaacaccc ttagaaaatg tgcctatct atcttccaaa tgcaatttga	3420
ttgactgccc attcaccaaa attatcctga actcttctgc aaaaatggat attattagaa	3480
attagaaaa aattactaat ttacacatt agattttatt ttactattgg aatctgatat	3540
actgtgtgct tgttttataa aattttgctt ttaattaaat aaaagctgga agcaaagtat	3600
aaccatatga tactatcata ctactgaaac agatttcata cctcagaatg taaaagaact	3660
tactgattat tttcttcatc caacttatgt ttttaaatga ggattattga tagtactctt	3720
ggtttttata ccattcagat cactgaattt ataaagtacc catctagtac ttgaaaaagt	3780

# ES 2 440 371 A1

```

aaagtgttct gccagatctt aggtatagag gaccctaaca cagtatatcc caagtgcact      3840
ttctaattgtt tctgggtcct gaagaattaa gatacaaatt aattttactc cataaacaga      3900
ctgttaatta taggagcctt aatttttttt tcatagagat ttgtctaatt gcatctcaaa      3960
attattctgc cctccttaat ttgggaaggt ttgtgttttc tctggaatgg tacatgtctt      4020
ccatgtatct tttgaactgg caattgtcta tttatctttt atttttttaa gtcagtatgg      4080
tctaactctg gcatgttcaa agccacatta tttctagtcc aaaattacaa gtaatcaagg      4140
gtcattatgg gttaggcatt aatgtttcta tctgattttg tgcaaaagct tcaaattaa      4200
acagctgcat tagaaaaaga ggcgcttctc ccctccccta cacctaaagg tgtatttaaa      4260
ctatcttgtg tgattaactt atttagagat gctgtaactt aaaatagggg atatttaagg      4320
tagcttcagc tagcttttag gaaaatcact ttgtctaact cagaattatt tttaaaaaga      4380
aatctggctt tgttagaaaa caaaatttta ttttgtgctc atttaagttt caaacttact      4440
atthtgacag ttatthtgat aacaatgaca ctagaaaact tgactccatt tcatcattgt      4500
ttctgcatga atatcataca aatcagttag tttttaggtc aagggttac tatttctggg      4560
tcttttgcta ctaagttcac attagaatta gtgccagaat tttaggaact tcagagatcg      4620
tgtattgaga tttcttaaat aatgcttcag atattattgc tttattgctt ttttgtattg      4680
gttaaaaactg tacatttaaa attgctatgt tactatthtc tacaattaat agtttgtcta      4740
ttttaaataa aattagttgt taagagtctt aa                                     4772

```

```

<210> 4
<211> 928
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 4
```

```
Met Pro Pro Lys Thr Pro Arg Lys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala
1           5           10           15
```

```
Ala Ala Glu Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Glu Glu Asp
          20           25           30
```

```
Pro Glu Gln Asp Ser Gly Pro Glu Asp Leu Pro Leu Val Arg Leu Glu
          35           40           45
```

```
Phe Glu Glu Thr Glu Glu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Cys Gln Lys Leu
          50           55           60
```

# ES 2 440 371 A1

Lys Ile Pro Asp His Val Arg Glu Arg Ala Trp Leu Thr Trp Glu Lys  
 65 70 75 80

Val Ser Ser Val Asp Gly Val Leu Gly Gly Tyr Ile Gln Lys Lys Lys  
 85 90 95

Glu Leu Trp Gly Ile Cys Ile Phe Ile Ala Ala Val Asp Leu Asp Glu  
 100 105 110

Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys Asn Ile Glu Ile Ser Val  
 115 120 125

His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile Asp Thr Ser Thr Lys Val  
 130 135 140

Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys Tyr Asp Val Leu Phe Ala  
 145 150 155 160

Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu Leu Ile Tyr Leu Thr Gln  
 165 170 175

Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn Ser Ala Leu Val Leu Lys  
 180 185 190

Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys Gly Glu Val Leu Gln Met  
 195 200 205

Glu Asp Asp Leu Val Ile Ser Phe Gln Leu Met Leu Cys Val Leu Asp  
 210 215 220

Tyr Phe Ile Lys Leu Ser Pro Pro Met Leu Leu Lys Glu Pro Tyr Lys  
 225 230 235 240

Thr Ala Val Ile Pro Ile Asn Gly Ser Pro Arg Thr Pro Arg Arg Gly  
 245 250 255

Gln Asn Arg Ser Ala Arg Ile Ala Lys Gln Leu Glu Asn Asp Thr Arg  
 260 265 270

Ile Ile Glu Val Leu Cys Lys Glu His Glu Cys Asn Ile Asp Glu Val  
 275 280 285

# ES 2 440 371 A1

Lys Asn Val Tyr Phe Lys Asn Phe Ile Pro Phe Met Asn Ser Leu Gly  
 290 295 300

Leu Val Thr Ser Asn Gly Leu Pro Glu Val Glu Asn Leu Ser Lys Arg  
 305 310 315 320

Tyr Glu Glu Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asp Leu Asp Ala Arg Leu Phe  
 325 330 335

Leu Asp His Asp Lys Thr Leu Gln Thr Asp Ser Ile Asp Ser Phe Glu  
 340 345 350

Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Asp Glu Glu Val Asn Val  
 355 360 365

Ile Pro Pro His Thr Pro Val Arg Thr Val Met Asn Thr Ile Gln Gln  
 370 375 380

Leu Met Met Ile Leu Asn Ser Ala Ser Asp Gln Pro Ser Glu Asn Leu  
 385 390 395 400

Ile Ser Tyr Phe Asn Asn Cys Thr Val Asn Pro Lys Glu Ser Ile Leu  
 405 410 415

Lys Arg Val Lys Asp Ile Gly Tyr Ile Phe Lys Glu Lys Phe Ala Lys  
 420 425 430

Ala Val Gly Gln Gly Cys Val Glu Ile Gly Ser Gln Arg Tyr Lys Leu  
 435 440 445

Gly Val Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Met Glu Ser Met Leu Lys Ser Glu  
 450 455 460

Glu Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser Lys Leu Leu Asn Asp Asn  
 465 470 475 480

Ile Phe His Met Ser Leu Leu Ala Cys Ala Leu Glu Val Val Met Ala  
 485 490 495

Thr Tyr Ser Arg Ser Thr Ser Gln Asn Leu Asp Ser Gly Thr Asp Leu  
 500 505 510

Ser Phe Pro Trp Ile Leu Asn Val Leu Asn Leu Lys Ala Phe Asp Phe  
 515 520 525

ES 2 440 371 A1

Tyr Lys Val Ile Glu Ser Phe Ile Lys Ala Glu Gly Asn Leu Thr Arg  
 530 535 540

Glu Met Ile Lys His Leu Glu Arg Cys Glu His Arg Ile Met Glu Ser  
 545 550 555 560

Leu Ala Trp Leu Ser Asp Ser Pro Leu Phe Asp Leu Ile Lys Gln Ser  
 565 570 575

Lys Asp Arg Glu Gly Pro Thr Asp His Leu Glu Ser Ala Cys Pro Leu  
 580 585 590

Asn Leu Pro Leu Gln Asn Asn His Thr Ala Ala Asp Met Tyr Leu Ser  
 595 600 605

Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Thr Thr Arg Val Asn Ser  
 610 615 620

Thr Ala Asn Ala Glu Thr Gln Ala Thr Ser Ala Phe Gln Thr Gln Lys  
 625 630 635 640

Pro Leu Lys Ser Thr Ser Leu Ser Leu Phe Tyr Lys Lys Val Tyr Arg  
 645 650 655

Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Asn Thr Leu Cys Glu Arg Leu Leu Ser Glu  
 660 665 670

His Pro Glu Leu Glu His Ile Ile Trp Thr Leu Phe Gln His Thr Leu  
 675 680 685

Gln Asn Glu Tyr Glu Leu Met Arg Asp Arg His Leu Asp Gln Ile Met  
 690 695 700

Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys Val Lys Asn Ile Asp Leu Lys  
 705 710 715 720

Phe Lys Ile Ile Val Thr Ala Tyr Lys Asp Leu Pro His Ala Val Gln  
 725 730 735

Glu Thr Phe Lys Arg Val Leu Ile Lys Glu Glu Glu Tyr Asp Ser Ile  
 740 745 750

# ES 2 440 371 A1

Ile Val Phe Tyr Asn Ser Val Phe Met Gln Arg Leu Lys Thr Asn Ile  
 755 760 765

Leu Gln Tyr Ala Ser Thr Arg Pro Pro Thr Leu Ser Pro Ile Pro His  
 770 775 780

Ile Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Phe Pro Ser Ser Pro Leu Arg Ile Pro  
 785 790 795 800

Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser Pro Tyr Lys Ile Ser  
 805 810 815

Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr Pro Arg Ser Arg Ile Leu  
 820 825 830

Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly Thr Ser Glu Lys Phe Gln Lys Ile  
 835 840 845

Asn Gln Met Val Cys Asn Ser Asp Arg Val Leu Lys Arg Ser Ala Glu  
 850 855 860

Gly Ser Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys Leu Arg Phe Asp Ile Glu  
 865 870 875 880

Gly Ser Asp Glu Ala Asp Gly Ser Lys His Leu Pro Gly Glu Ser Lys  
 885 890 895

Phe Gln Gln Lys Leu Ala Glu Met Thr Ser Thr Arg Thr Arg Met Gln  
 900 905 910

Lys Gln Lys Met Asn Asp Ser Met Asp Thr Ser Asn Lys Glu Glu Lys  
 915 920 925